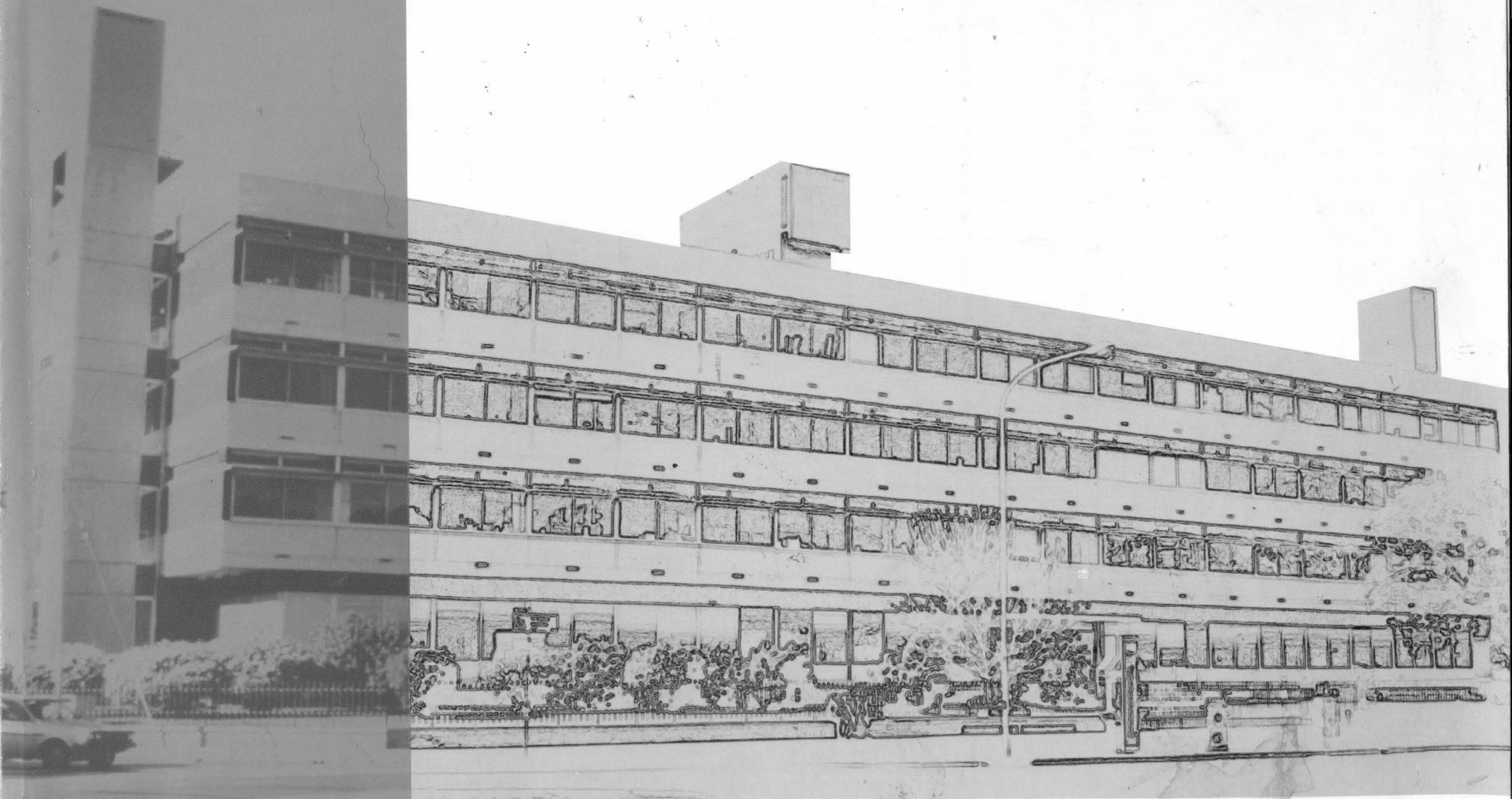
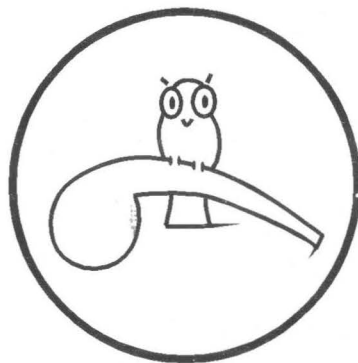


INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
BIOQUIMICAS

FUNDACION CAMPOMAR



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS **FUNDACION CAMPOMAR**



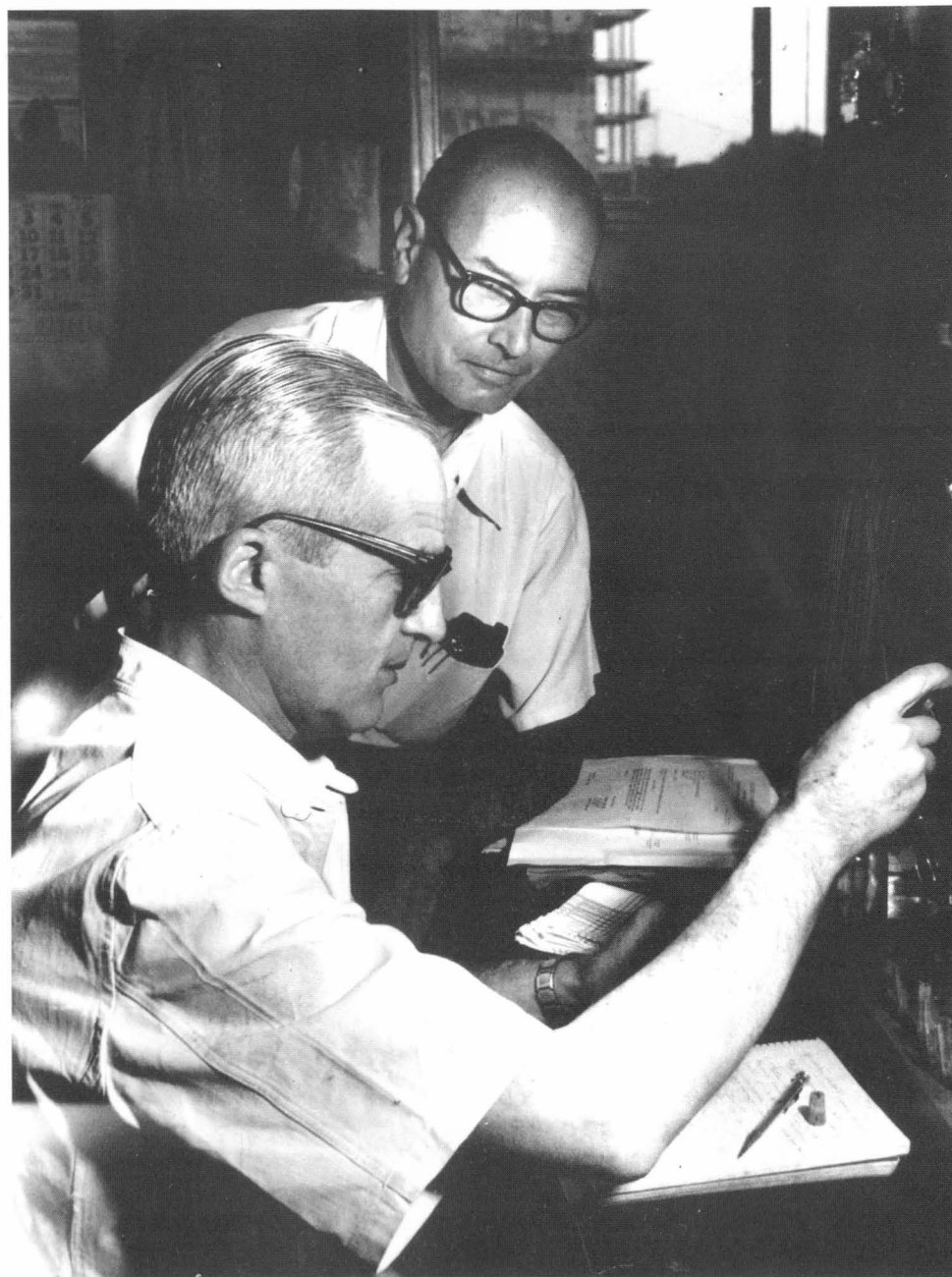
 **Bagó**
Etica al servicio de la salud

 **Edenor**
Las cosas más claras.



**FUNDACION
ROUX-OCEFA**


ROEMMERS
CONCIENCIA POR LA VIDA



Los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini trabajando en el laboratorio (alrededor de 1960) / Dr. Luis F. Leloir and Dr. Carlos E. Cardini working in the lab (around 1960).

El Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar fue creado en 1947 con el apoyo económico de Jaime Campomar, conocido industrial que se había dedicado a obras de beneficio social en su empresa y fuera de ella. El Señor Campomar quiso ampliar esta actividad y pensó fundar un Instituto de Investigaciones privado para hacer ciencia básica. Con la llegada del Dr. Leloir de los Estados Unidos, el Dr. Houssay sugirió que el Instituto se dedicara a la Bioquímica y propuso el nombre de Leloir como director, a quien conocía por haber dirigido su Tesis Doctoral. En todas estas conversaciones y toma de decisiones tuvo gran influencia el Dr. C.E. Cardini, que era amigo y cuñado de Jaime Campomar. El Dr. Cardini había sido dejado cesante unos meses antes en la Universidad de Tucumán por razones políticas y había regresado a Buenos Aires con deseos de continuar sus investigaciones en un sitio libre de interferencias políticas. Por la gran modestia que lo caracterizaba al Dr. Cardini, la influencia que tuvo en ese importante evento, pasó desapercibida durante muchos años.

El 3 de noviembre de 1947 se inauguró el Instituto, siendo el Dr. Leloir su director y posteriormente su presidente hasta su muerte ocurrida el 2 de diciembre de 1987. El grupo inicial de investigadores estuvo formado por los Doctores L.F. Leloir, C.E. Cardini (subdirector), R. Capputo, R. Trucco y A. Paladini.

Durante los diez primeros años se trabajó en una casa privada convertida en laboratorio, que estaba ubicada en el barrio de Palermo. Esta época fue muy fructífera; en ella se conjugaron varios factores favorables: elección de un tema con futuro (sin seguir «la moda» científica del momento) y una dirección eficiente del Instituto. Además se pudo trabajar con tranquilidad, sin trabas burocráticas, ni presiones políticas. El número de investigadores durante la primera época, fue de aproximadamente 5 ó 6, con algunos cambios que permitieron que jóvenes brillantes (como el Dr. Cabib y otros) se unieran al grupo inicial.

El primer tema de investigación, sugerido por Ranwel Caputto, fue la formación de galactosa en la glándula mamaria. La idea original fue que en ese tejido la glucosa debía ser un precursor de la galactosa. Trabajando con levadura cultivada en presencia de galactosa como sistema modelo, el Dr. Leloir y sus colaboradores pudieron en poco tiempo aislar dos nuevas coenzimas. La primera de ellas resultó ser glucosa 1,6 difosfato, que actúa como coenzima de una importante etapa de la glicólisis catalizada por la fosfoglucomutasa. Este descubrimiento permitió que el grupo de la Fundación Campomar comenzara a ser internacionalmente conocido, y que en momentos de dificultad económica obtuviera subsidios de la Fundación Rockefeller y del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH), algunos de los cuales fueron renovados muchas veces por más de veinte años.

La otra coenzima que encontraron, lábil al calor, fue más importante aún porque descubrieron una familia de compuestos: los nucleótido-azúcares. En relativamente poco tiempo también pudieron aclarar sus estructuras.

El primer representante del grupo de nucleótido-azúcares fue la uridina difosfato glucosa (UDPG). Todos estos compuestos permitieron aclarar muchos caminos metabólicos desconocidos hasta entonces. Estos descubrimientos, como todos los trabajos posteriores en este tema hicieron que Leloir recibiera en 1970 la distinción internacional más importante para un científico: el Premio Nobel de Química concedido por la Academia de Ciencias de Suecia.

En 1957, el último año en la casa de Julián Alvarez, murió Jaime Campomar. Más o menos al mismo tiempo Leloir recibió interesantes ofrecimientos de la Fundación Rockefeller y del Massachusetts General Hospital para emigrar a los Estados Unidos. Pero el Dr. Leloir, como su maestro Houssay, prefirió quedarse y continuar trabajando en su

país. El año siguiente firmó un acuerdo con el Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Dr. Rolando García, por el cual se creó el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales nombrando profesores titulares a Leloir, Cardini y Cabib. Además, el Ministro de Asistencia Social y Salud Pública, Dr. Francisco Martínez, cedió al Instituto un viejo edificio del barrio de Belgrano. El Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar en su nueva casa y con la cercanía de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales creció lentamente. Esto contribuyó a atraer a la investigación científica a jóvenes universitarios argentinos. También llegaron al Instituto investigadores y becarios de los Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Francia y España y varios países Latinoamericanos. Hacia fines de la década del 60 el Instituto obtuvo su Personería Jurídica.

En 1970, cuando la Academia de Suecia le otorgó el Premio Nobel, Leloir acababa de descubrir la función de otro grupo muy importante de compuestos, los intermediarios lípido-azúcares, que habían sido recientemente descriptos en bacterias. Estos trabajos de Leloir y colaboradores permitieron aclarar la biosíntesis de glicoproteínas.

Como el espacio en los laboratorios de la calle Obligado ya no alcanzaba por el aumento del número de investigadores y becarios se planteó la necesidad de cambiar de edificio. Después de varios años, hacia fines de 1983, el Instituto pudo mudarse a sus actuales instalaciones frente al Parque Centenario. El nuevo edificio fue construido gracias a la ayuda financiera de toda la comunidad y el apoyo de la Ciudad de Buenos Aires.

El pequeño grupo original de investigadores había crecido, formando grupos independientes en diversas áreas de Bioquímica y Biología, y algunos investigadores del Instituto formaron otros centros de investigación en el país o emigraron al extranjero.

Actualmente trabajan en la Fundación Campomar 33 investigadores, 28 estudiantes graduados y otros 40 miembros que forman los equipos técnicos y de administración.

El tema original único de investigación sobre el rol de los nucleótido azúcares en el metabolismo de carbohidratos se ha diversificado en una variedad de proyectos en distintos campos de la Bioquímica y la Biología Molecular que se describen en esta Memoria.

A través de los años más de 100 estudiantes han realizado en el Instituto sus trabajos de tesis doctoral. Además se han dictado numerosos cursos de grado y posgrado correspondientes a varias carreras de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Muchos de estos cursos cuentan con la asistencia de estudiantes de varias Universidades del país y de Latinoamérica, y en ellos participan junto a los investigadores del Instituto profesores del extranjero.

Complementando los laboratorios de investigación del Instituto existe un grupo de gente trabajando en periodismo científico (C y T) bajo la dirección del Dr. E. Belocopitow.

Uno de los aspectos destacables de la Fundación es su Biblioteca, una de las más completas de Latinoamérica en Bioquímica y otras ciencias relacionadas. Posee colecciones ininterrumpidas de las más prestigiosas revistas internacionales desde su creación, muchas de ellas provenientes de donaciones personales del Dr. Leloir. Creció gracias a la dedicación de muchos investigadores del Instituto, especialmente del Dr. Cardini, y funciona como

Biblioteca pública ofreciendo sus servicios a numerosos estudiantes y científicos de todo el país. Ha sido declarada de "Referencia Nacional" por el Congreso argentino.

Cuando en noviembre de 1947 Leloir inauguró el nuevo centro de investigación dijo estas proféticas palabras: "el Instituto de Investigaciones Bioquímicas comienza sus actividades en un local pequeño y provisorio, pero esperemos que sean grandes su labor y su futuro".

The Instituto de Investigaciones Bioquímicas was born in 1947 thanks to the financial support of Jaime Campomar, who was a well-known businessman caring about the social aspects of industry both in and outside his own firm. He decided to broaden his field of action and establish a private research institute devoted to basic science. Dr. Houssay recommended Luis F. Leloir, one of his former Ph.D. students, to be appointed Director of a new Biochemistry Institute. A very important role in these dealings was played by Dr. Carlos E. Cardini, a friend and relative of Jaime Campomar. Dr. Cardini, a Professor of Biochemistry in the University of Tucumán, who had been made redundant for political reasons, was at that time back in Buenos Aires and was eager to continue doing research.

On November 3, 1947, the Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar began its existence; Luis F. Leloir was its Director and afterwards its President until his death on December 2, 1987. The original team of research was completed with Carlos Cardini, Ranwel Caputto, Raúl Trucco and Alejandro Paladini. During the first ten years work was carried out in a private house transformed into laboratory, located in the neighbourhood of Palermo. The choice of a promising project and a very efficient direction contributed to making those early years a very fruitful period, of relaxed and happy work with no bureaucracy nor political pressures. Some talented young people like Enrico Cabib joined the group, which consisted of 5 or 6 persons at that time.

The first subject of investigation, suggested by Ranwel Caputto, was the formation of galactose in the mammary gland. They thought that in that tissue glucose should be the precursor of galactose, a constituent of milk lactose. Thanks to the use of yeast cultivated in galactose as a model system they were able to isolate two new coenzymes. The discovery of one of them, a coenzyme of phosphoglucomutase -an important enzyme of glycolysis- enabled the Campomar group to be internationally known and to be awarded a grant from NIH, which was renewed for over 20 years.

The second coenzyme isolated in the Institute was the first member of a now large family of compounds, the nucleotide sugars, which participate in many essential biological processes. In 1970, the Swedish Academy of Sciences awarded the Nobel Prize in Chemistry to Dr. Leloir for his contributions to this field.

Jaime Campomar died in 1957 and Luis F. Leloir, who had declined some invitations to move to the United States with his group, was able to change to larger premises. The following year an agreement was signed with Rolando García, Dean of the Faculty of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires, to create the Instituto de Investigaciones Bioquímicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, with Leloir, Cardini and Cabib as full professors. This helped to attract students to scientific research, not only from the University of Buenos Aires, but also from other Argentine and Latin American universities. Fellows from the United States, Japan, England, Spain, France and other countries spent also some periods of time at the Institute.

In the last month of 1983, the Instituto de Investigaciones Bioquímicas was able to move to its present especially built quarters thanks largely to the financial help of the whole community and the support of the City of Buenos Aires.

The original small team of researchers had grown into several independent groups, some of which moved to other research centers not only in Buenos Aires but also in other parts of the country and abroad.

At present there are 33 investigators, 28 graduate students and 40 supporting staff including technicians and administration. The primitive single subject of the role of nucleotide sugars in the metabolism of carbohydrates has mushroomed into an assortment of projects in several fields of Biochemistry and Molecular Biology, as detailed in the following pages. Through the years over 100 students have worked for their Ph.D. and Master degrees. The Institute is involved in the teaching of several Graduate and Postgraduate courses from the Faculty of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires. Furthermore, every year professors from abroad participate in special short courses, open also to students from Latin American countries, on recent techniques and advances in leading subjects.

Complementing the investigations being carried out at the Institute, there is also a group of people working in scientific journalism (CyT), under the direction of E. Belocopitow.

One of the most important elements of the Institute is the library, with complete up-to-date collections of the most significant international publications in Biochemistry, Molecular, Cellular and Plant Biology and Microbiology; many collections are personal donations of Dr. Luis F. Leloir. The library is open to all students and investigators and is connected with other libraries of the country.

Leloir's inaugural speech in November 1947 was prophetic; he said: "The Instituto de Investigaciones Bioquímicas initiates its activities in a small and provisional house, but we hope for a great performance and future".



Durante la preparación de esta Memoria hemos sufrido la pérdida de una excelente investigadora, la Dra. Juana Tandecarz, quien murió el 10 de diciembre de 1996, a los 55 años, después de una seria y fulminante enfermedad. Su ausencia va a ser difícil de aceptar para todos nosotros que la hemos conocido desde su ingreso al grupo del Dr. Carlos E. Cardini en 1969, donde inició sus primeros años de investigación en nuestro Instituto. Actualmente era miembro del Consejo Directivo y del Comité Ejecutivo.

Juana Tandecarz no era sólo una buena investigadora, sino que además era una verdadera amiga a quien se podía pedir consejo y ayuda. Siempre demostró tener tiempo para los demás. Tal vez la característica más acentuada de su personalidad fue la de ser buena compañera, generosa, correcta en sus principios y en su actuar. Hacía honor a su tradición y a su segundo nombre, Sara, siendo un buen ejemplo de "la mujer fuerte de la Biblia". Tenía una rara cualidad, que se da en pocas personas, sabía escuchar con atención y no mezclaba sus propios problemas con el de su interlocutor. A eso le ayudaba su carácter reservado con sus propias cosas. Ella siempre decía, riéndose, que posiblemente en "la otra vida" había sido psicóloga o analista. Otro aspecto de su interesante personalidad, que llamaba la atención era su genuina modestia con sus discípulos y colegas. Esto le permitió ganarse la admiración de todos aquellos que la conocieron en el Instituto y también en la comunidad científica.

Las sólidas contribuciones científicas del grupo de investigación que ella dirigía permitieron dilucidar cómo las plantas se ingenian para efectuar las etapas iniciales y cruciales necesarias para acumular almidón, el carbohidrato de mayor importancia presente en ellas, y que provee de fuente de energía requerida para la supervivencia de los organismos animales. Su impecable y admirable trabajo permitió identificar la existencia, en plantas de papa, de una proteína cuyo papel específico es el de servir como soporte para que se agreguen los azúcares que componen el almidón. Su contribución original ha estimulado a científicos extranjeros quienes están tratando de determinar las bases genéticas y moleculares de dicha proteína.

Juana Tandecarz, por todas las facetas de su personalidad y sus contribuciones a la bioquímica vegetal que han tenido gran repercusión en el país y en el exterior, ha ganado un sólido respeto en el ambiente científico internacional.

While this Memory was being written and assembled, the Institute suffered a severe loss: Dr. Sara Juana Tandecarz died at 55, on December 10th, 1996, after a short but devastating illness. Her absence will be very hard to accept for all of us, who have known her since she entered Professor Carlos E. Cardini's group in 1969. At the time of her passing she was a member of both, the Board of Directors and the Executive Committee of our Institution.

In addition to being an excellent researcher, Juana Tandecarz was a true friend, always available to offer help and advise. She was genuinely modest despite her achievements. The scientific contributions of the research group she led, on her own after Professor Cardini's death, allowed the elucidation of the pathways followed by plants to start the synthesis and accumulation of starch, their major reserve polysaccharide. Her brilliant work showed the presence, in potato plants, of a protein whose specific role is to serve as a scaffold on which starch is built. Her original contribution has stimulated other scientists, who are engaged at present in determining the genetic and molecular basis of this process.

Juana Tandecarz deserves the appreciation and respect of the Argentinian and international scientific community, both for her personal gifts and for her sound contributions to plant Biochemistry.

Héctor Carminatti

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FUNDACION CAMPOMAR
1993 -1994**

CONSEJO DIRECTIVO / BOARD OF DIRECTORS:

Presidente / <i>President</i>	Israel D. Algranati
Vice- Presidente / <i>Vice-President</i>	Héctor Carminatti
Secretario / <i>Secretary</i>	José M. Olavarría
Vocales / <i>Members of the Board</i>	Marcelo A. Dankert
	Luis A. Quesada Allué
	Ricardo A. Wolosiuk
	Nicolás Behrens

COMITE EJECUTIVO / EXECUTIVE BOARD:

Director / <i>Director</i>	Ricardo A. Wolosiuk
Vice-Director / <i>Vice-Director</i>	Héctor Carminatti
Vice-Director 2do / <i>Vice-Director 2nd</i>	José M. Olavarría
Secretario / <i>Secretary</i>	Sara H. Goldemberg
Tesorero / <i>Treasurer</i>	Luis Ielpi

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
BUENOS AIRES (IIBBA) - CONSEJO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS**

Director / <i>Director</i>	Marcelo A. Dankert
Vice-Director / <i>Vice-Director</i>	Armando J. Parodi

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Director / *Director*

Luis A. Quesada Allué

Secretaria Académica / *Academic Secretary*

Juana S. Tandecarz

Dirección / *Address:*

Av. Patricias Argentinas 435

Antonio Machado 151

(1405) - Buenos Aires - Argentina

Teléfono / *Phone Number:*

863-4015/19

Número de Fax / *Fax Number:*

865-2246

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FUNDACION CAMPOMAR
1995 -1996**

CONSEJO DIRECTIVO / BOARD OF DIRECTORS:

Presidente / <i>President</i>	Marcelo A. Dankert
Vice-Presidente / <i>Vice-President</i>	Héctor Carminatti
Secretario / <i>Secretary</i>	Israel D. Algranati
Vocales / <i>Members of the Board</i>	Clara R. Krisman
	Juana S. Tandecarz
	Luis Ielpi
	Juan José Cazzulo
	Nicolás Behrens

COMITE EJECUTIVO / EXECUTIVE BOARD:

Director / <i>Director</i>	Clara R. Krisman
Vice-Director / <i>Vice-Director</i>	Luis Ielpi
Vice-Director 2do / <i>Vice-Director 2nd</i>	Juan José Cazzulo
Secretario / <i>Secretary</i>	Osvaldo L. Podhajcer/
	Héctor Carminatti
Tesorero / <i>Treasurer</i>	Juana S. Tandecarz

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
BUENOS AIRES (IIBBA) - CONSEJO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS**

Director / <i>Director</i>	Marcelo A. Dankert
Vice-Director / <i>Vice-Director</i>	Armando J. Parodi

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Director / *Director*

Luis A. Quesada Allué
(hasta 27 de noviembre
de 1995)

Juana S. Tandecarz

Secretaria Académica / *Academic Secretary*

Juana S. Tandecarz
(hasta 27 de noviembre
de 1995)

Luis Ielpi

Dirección / *Address:*

Av. Patricias Argentinas 435
Antonio Machado 151
(1405) - Buenos Aires - Argentina

Teléfono / *Phone Number:*

863-4015/19

Número de Fax / *Fax Number:*

865-2246

COMITE CIENTIFICO INTERNACIONAL
INTERNATIONAL SCIENTIFIC BOARD

Dr. Francisco Baralle

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)
Padriciano 99, 34012 Trieste, Italy

Dr. Roberto A. Bogomolni

Department of Chemistry and Biochemistry, University of California - Santa Cruz
1156 High Street, Santa Cruz, California 95064, United States of America

Dr. Enrico Cabib

Laboratory of Biochemistry and Metabolism
National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, United States of America

Dr. Eduardo De Robertis

University of California, Los Angeles, Department of Biological Chemistry
10833 Le Conte Avenue, Los Angeles, California 90024-1737, United States of America

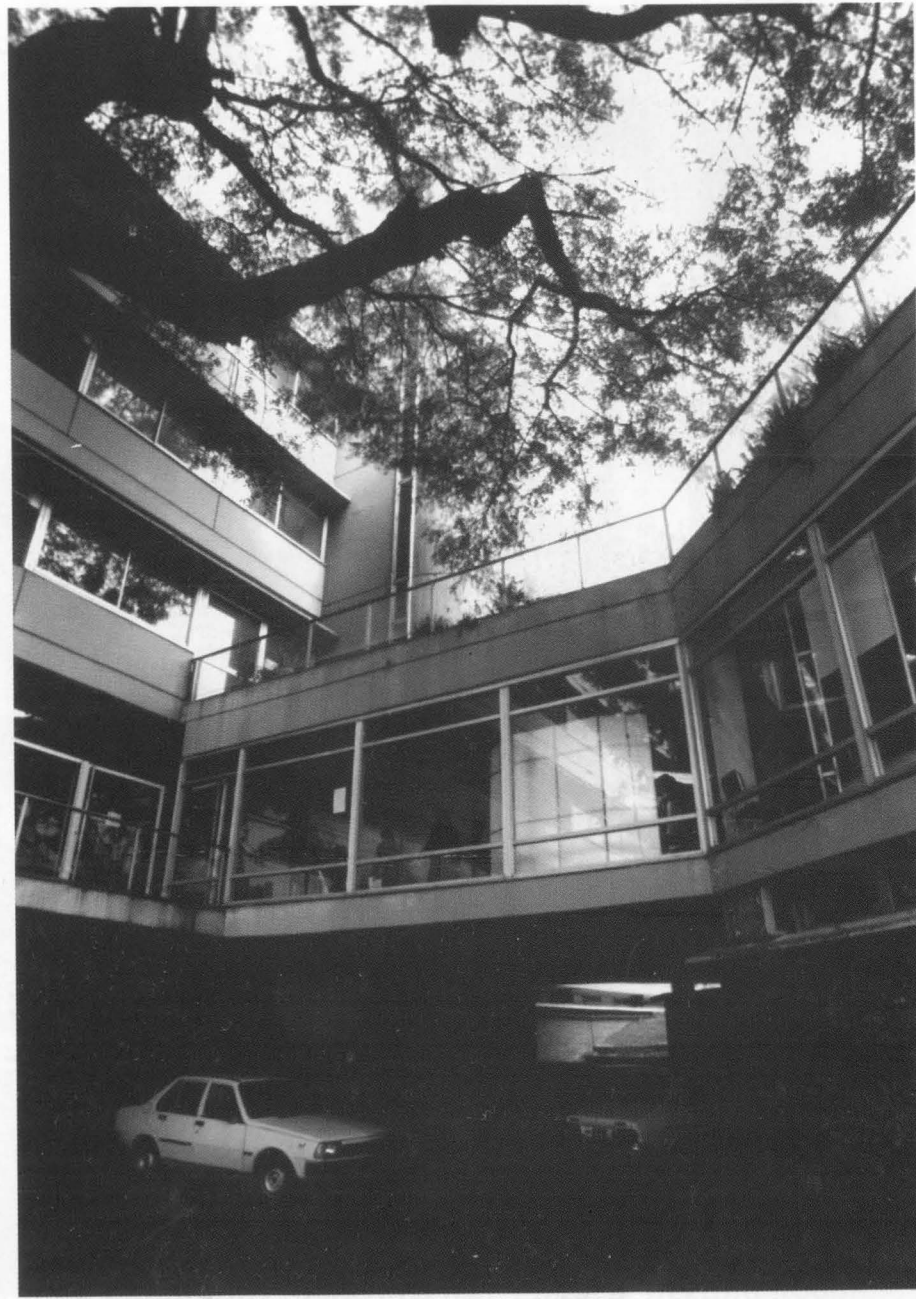
Dr. Cesar Milstein

Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology
Hills Road, Cambridge CB2 2QH, England

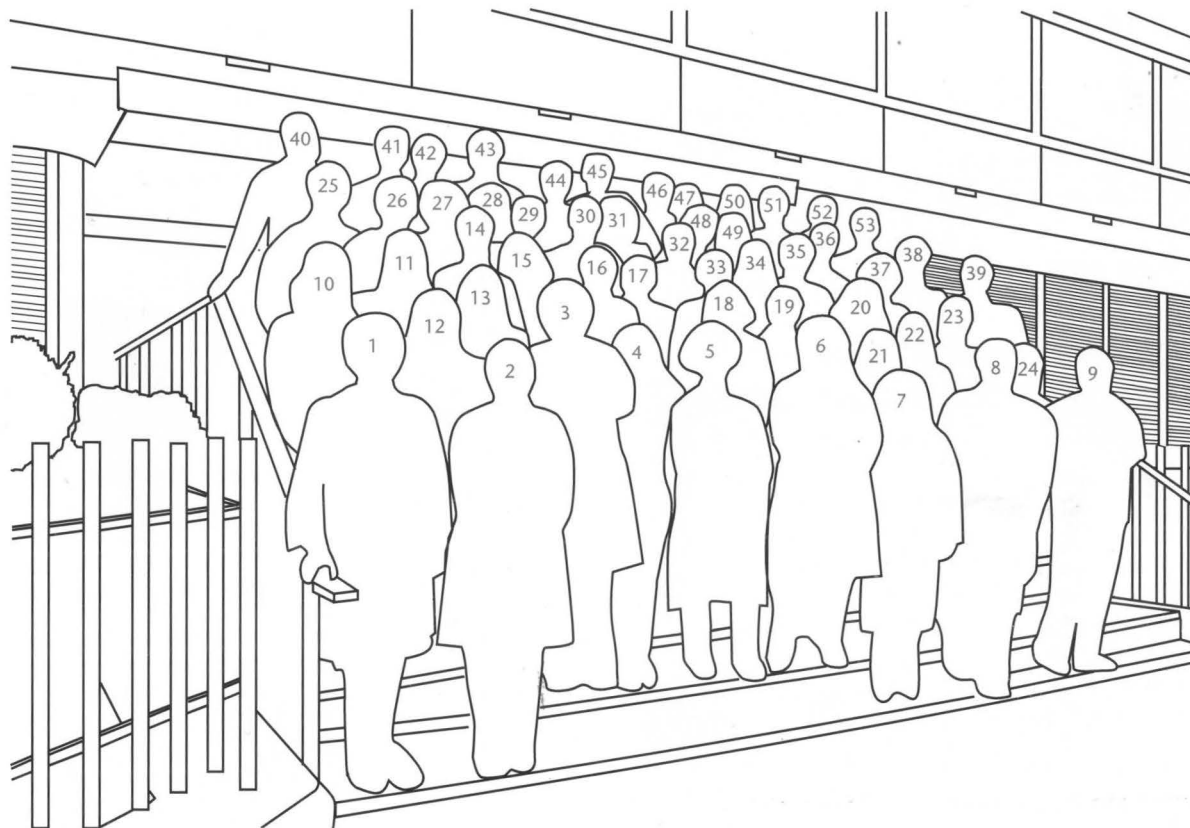
Dr. David E. Sabatini

New York University, Department of Cell Biology, School of Medicine
550 First Avenue, New York, NY 10016, United States of America

Lab 101 - Laboratorio de Bioquímica Tumoral / <i>Laboratory of Tumor Biochemistry</i>	1
Lab 102 - Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Desarrollo / <i>Laboratory of Developmental Biochemistry and Molecular Biology</i>	15
Lab 104 - Laboratorio de Señalización Molecular / <i>Molecular Signalling Laboratory</i>	23
Lab 106 - Laboratorio de Biosíntesis de Almidón en Tejidos de Plantas Superiores / <i>Laboratory of Biosynthesis of Starch in Higher Plant Tissues</i>	30
Lab 107 - Laboratorio de Biología Celular y Molecular / <i>Laboratory of Cellular and Molecular Biology</i>	38
Lab 108 - Laboratorio de Biosíntesis y Estructura de Polisacáridos de Reserva / <i>Laboratory of Biosynthesis and Structure of Storage Polysaccharides</i>	42
Lab 109 - Laboratorio de Neuroquímica / <i>Laboratory of Neurochemistry</i>	51
Lab 112 - Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos / <i>Laboratory of Molecular Biology of Parasites</i>	60
Lab 201 - Laboratorio de Regulación de Síntesis Proteica y Proliferación en Bacterias y Parásitos / <i>Laboratory of Protein Synthesis and Proliferation in Bacteria and Parasites</i>	66
Lab 202 - Laboratorio de Poliaminas en Bacterias y Levaduras / <i>Laboratory of Polyamines in Bacteria and Yeast</i>	72
Lab 204 - Laboratorio de Biosíntesis de Polisacáridos Complejos en Bacterias y Compuestos Vinculados / <i>Laboratory of Complex Carbohydrates in Bacteria and Related Subjects</i>	76
Lab 206 - Laboratorio de Biología Vegetal / <i>Laboratory of Plant Biology</i>	83
Lab 207 - Laboratorio de Interacción Microorganismos-Plantas / <i>Laboratory of Microbe-Plant Interaction</i>	90
Lab 208 - Laboratorio de Biología Molecular de Plantas / <i>Laboratory of Plant Molecular Biology</i>	96
Lab 209 - Laboratorio de Glicobiología / <i>Laboratory of Glycobiology</i>	100
Lab 212 - Glicoproteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Glycoproteins from Bacillus thuringiensis</i>	109
Lab 213 - Laboratorio de Genética Bacteriana / <i>Laboratory of Bacterial Genetics</i>	112
Lab 302 - Laboratorio de Bioquímica de Parásitos / <i>Laboratory of Biochemistry of Parasites</i>	121
Personal de Apoyo Técnico / <i>Technical Assistance</i>	135
Programa de Divulgación Científica y Técnica / <i>Programme for Science and Technology Popularization</i>	137
Conferencistas del Exterior	143
Cursos de Post-grado / <i>Post-Graduate Courses</i>	146







1- Clara R. Krisman, 2- Mara Gil, 3- Luis Quesada, 4- María Rosa Sorol, 5- Nélida S. González, 6- Flavia Wald, 7- Carolina Carrillo, 8- José Mordoh, 9- Manuel García Patrone, 10- Diana S. Tolmasky, 11- Karin Hagelin, 12- Lorena Lerner, 13- Marta Bravo, 14- Irma Mastronardi, 15- Susana Raffo, 16- Israel D. Algranati, 17- Sara H. Goldemberg, 18- Silvia Moreno, 19- Belén Cadenas, 20- Fabiola Parussini, 21- Verónica Ielmini, 22- Vilma Duschak, 23- Liliana Sferco, 24- Olga Castro, 25- Javier Di Noia, 26- Daniel E. Bassi, 27- María de los Angeles Curto, 28- Denise Muñoz, 29- Paula Semerdjian, 30- Maximiliano López Mic, 31- Paula Duek, 32- Marcelo A. Dankert, 33- Laura Bover, 34- Mara Roset, 35- Pablo Varela, 36- Mario Feldman, 37- Sebastián Kadener, 38- Federico Katzen, 39- Nazareno Castillo Marin, 40- Daniel Sánchez, 41- Carlos Buscaglia, 42- Marcelo Guerín, 43- Eduardo Cafferata, 44- Roberto Rodríguez Suárez, 45- Santiago Mora García, 46- Adrián Vojnov, 47- Moira Sauane, 48- Mariano Salibe, 49- Laura Cremona, 50- Fernanda Ledda, 51- Diego Comerici, 52- Cristian Odo, 53- Juan Mucci.



La Biblioteca



The Library



Salón Auditorio / *Lecture Hall* "Alfredo Fortabat"

Lab 101

Laboratorio de Bioquímica Tumoral

Laboratory of Tumor Biochemistry



Personal Permanente / Permanent Staff

José Mordoh

Osvaldo Luis Podhajcer

Laura Bover

Tesistas / Ph.D. Students

Laura Bover (hasta Junio / until June 1995)

Verónica Morvillo

Claudia Kairiyama

María Marcela Barrio

Mariana Capurro

María Fernanda Ledda (desde Marzo de 1994, tesista del Dr. Podhajcer / since March 1994, Dr Podhajcer's Ph.D. student).

Estudiantes No Graduados / Undergraduate Students

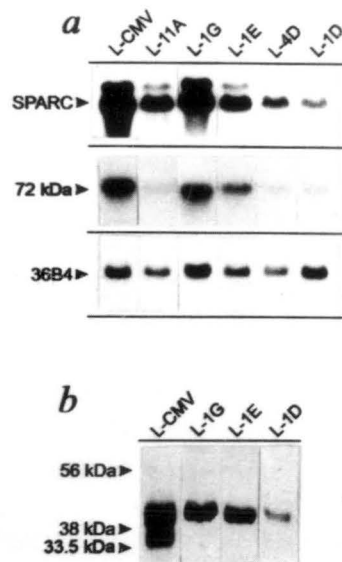
Jorge L. Schettini. Becario de Fundación Antorchas, Facultad de Genética, Universidad Nacional de Misiones, UNAM. Director: Dr. Podhajcer, (Marzo - Octubre 1995)

Personal de Apoyo a la Investigación / Technical Staff

Licia Battaglia (hasta Mayo / until May 1993)

Soraya Adris

Paula Portela (desde Abril / since April 1993)



a) Northern-blot
Disminución de los niveles de SPARC y gelatinasa A (72 kDa) en clones de la línea celular de melanoma humano IIB-Mel-LES transfectada con el cDNA de SPARC antisentido.

b) Western-blot
Detección de la proteína SPARC en medios condicionados por los clones anteriores.

a) Northern-blot
Decrease in SPARC and gelatinase A (72 kDa) levels in IIB-Mel-LES clones transfected with SPARC antisense cDNA.
b) Western-blot
Detection of SPARC protein in cell free conditional media of the above mentioned clones.

Las investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio están orientadas al estudio de diferentes áreas:

1) Biología, genética, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama

La teoría de la presencia de una jerarquía celular en los tumores ha recibido un apoyo considerable en los últimos años. Componentes esenciales de dicha jerarquía podrían ser las células troncales (*stem*), células transicionales y células diferenciadas. Dado que aparentemente un tumor puede ser erradicado sólo si es eliminado el reservorio de células troncales, nuestro trabajo se ha orientado a identificar dichas células y desarrollar estrategias con tal propósito.

En el marco de este proyecto, hemos desarrollado una serie de anticuerpos monoclonales (AMC) dirigidos contra diversos tumores, especialmente contra cáncer de mama y melanoma humanos. El mejor estudiado hasta el presente es el AMC murino FC-2.15, dirigido contra las células troncales de cáncer de mama. El mismo ha mostrado poseer gran reactividad *in vitro* con tumores de mama y colon, entre otros. Dadas sus características ya ha sido utilizado en un **Ensayo Clínico de Fase I** sobre 11 pacientes con cáncer avanzado. En dicho Ensayo no se observaron efectos tóxicos de consideración aún a las dosis máximas toleradas, habiéndose observado algunos efectos terapéuticos importantes, tales como una reducción mayor del 50% de metástasis hepáticas de carcinoma de mama, remisión de metástasis peritoneales de cáncer de colon y remisión de metástasis pulmonares de carcinoma medular de tiroides.

Inmunizando ratones con células de la línea celular de cáncer de mama humano IIB-BR-G, establecida en nuestro laboratorio, se obtuvo una nueva serie de AMC. Entre ellos el FC-5.01 reconoce el 100% de melanomas humanos y 80% de adenocarcinomas de mama. Su

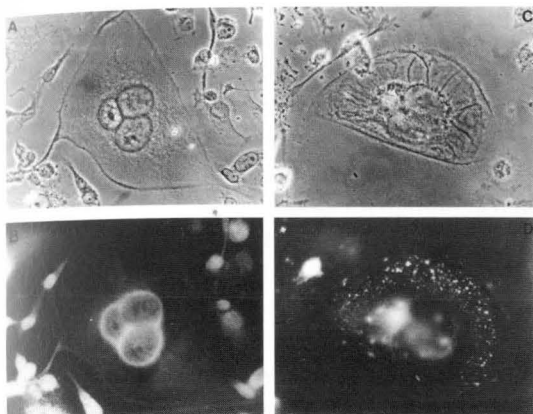
The research performed in our laboratory is oriented to the study of different areas:

1) Biology, genetics, diagnosis and treatment of breast cancer

The presence of a cellular hierarchy in tumors has received considerable support in recent years. Essential components of such hierarchy would be the stem, transitional and differentiated cells. Since apparently a tumor may only be eradicated if the stem cells reservoir is eliminated, our work has been oriented to identify those cells and devise strategies to that purpose.

In an attempt to obtain further insight in this research we have developed monoclonal antibodies (MAb) directed against a variety of tumors, specially human breast cancer and melanoma. The best studied of these MAbs is the murine FC-2.15, developed against stem breast cancer cells. FC-2.15 has shown *in vitro* positive reaction with breast and colon human tumors. On the basis of its properties, a Phase I Clinical Trial was undertaken in 11 patients with advanced cancer. During this Clinical Trial, considerable toxic effects were not observed, even at the highest tolerated doses. Objective partial responses, such as a sustained 50% reduction of breast carcinoma liver metastases, a remission of medullar thyroid carcinoma pulmonary metastases and a remission of colon carcinoma peritoneal metastases were observed.

By immunization of mice with cells from the breast carcinoma cell line IIB-BR-G, established in our laboratory, we obtained a new group of MAbs. Among these, FC-5.01 recognizes 100% of human melanomas and 80% of mammary adenocarcinomas. It shows slight reactivity with normal organs. *In vitro* assays demonstrated that MAb FC-5.01 binds to cells membranes and it was internalized to intracytoplasmatic vesicles when cells were incubated at 37°C. Since this MAb does not induce cell lysis in FC-5.01-positive cells, it was selected to produce radiolabeled immunoconjugates in order to employ it in human tumor



Immunofluorescence reaction performed with FC-2.05, a monoclonal antibody obtained in our laboratory, specific for human breast cancer cells.

A, B, C and D IIB-BR-G, human breast cancer cell line, established in our laboratory, from a primary tumor.

A and B: Cells fixed with cold acetone.

C and D: Cells fixed with 10% formalin.

A and C: Phase contrast microphotograph.

B and D: Immunofluorescence microphotograph of the same fields showed in A and C respectively Magnification 400x.

reactividad en órganos normales es débil. En experimentos *in vitro* se ha observado que el AMC FC-5.01 se une a las membranas de las células, internalizándose a vesículas intracitoplasmáticas cuando las mismas son incubadas a 37°C. Puesto que este AMC no produce lisis de las células que expresan el antígeno (Ag) que él reconoce, se lo ha seleccionado para utilizarlo en la preparación de radioinmunoconjugados (con isótopos radioactivos) para tratamiento y detección de tumores humanos. Este proyecto se realiza en colaboración con la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Además de su utilización clínica, estos anticuerpos están siendo evaluados en cuanto a su modo de acción, la secuencia nucleotídica de los genes correspondientes y la localización y caracterización del Ag que reconocen.

Los pacientes tratados con AMC murinos, desarrollan anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), hecho que interfiere con la aplicación de esta terapia durante períodos prolongados. Una forma de superar este problema, es la utilización de drogas inmunosupresoras, o bien proceder a la "humanización del anticuerpo". Esto implica la construcción mediante el uso de técnicas de Ingeniería Genética, de una proteína quimérica murina-humana de los AMC que demuestren interés clínico. Este último proyecto se realiza en colaboración con el Laboratorio de Inmunología Molecular que dirige el Dr. Oscar Burrone en el ICGB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology), UNIDO (Trieste-Italia), habiéndose ya obtenido algunos clones de mielomas murinos productores del AMC quimérico FC-2.15.

2) Heterogeneidad tumoral y diferenciación en líneas celulares de tumor de mama y en melanomas primarios o metastásicos

Nuestro laboratorio se ha interesado particularmente en la biología de la heterogeneidad tumoral y del

radiolocalización and clinical use. This project is performed in collaboration with the Comisión Nacional de Energía Atómica.

We are also evaluating the way of action of these MAb, the nucleotide sequence of the corresponding genes and the localization and characterization of their recognized antigens.

Since all patients treated with murine MABs developed human anti-murine antibodies (HAMA) that interfere with their clinical appliance, we have also proceeded to "MAbs humanization", which means the construction of a chimaeric murine-human MAB by using Genetic Engineering techniques. MABs submitted to this procedure were selected according to their usefulness in therapy. In a collaborative research project with the Laboratory of Molecular Immunology of the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, UNIDO (Trieste-Italy), whose Director is Dr. Oscar Burrone, we have obtained several clones of the chimaeric MAB FC-2.15.

2) Tumor heterogeneity and differentiation of human breast tumor cell lines and primary or metastatic melanomas

Our laboratory is interested in the biology of heterogeneity and differentiation of human breast tumors and melanomas. This knowledge can be achieved by the establishment of new cell lines, which might allow us to understand the mechanisms prevailing for the development and differentiation in each type of tumors and lead us to attempt more effective therapies.

Recently we were successful in establishing two new human melanoma cell lines. Through their characterization, they have demonstrated to be suitable as powerful tools for our purposes. They could be also employed in the characterization of MABs developed in our laboratory and in immunotherapy protocols with antitumor vaccines.

Recently we have reported the expression of the protease

proceso de diferenciación, tanto de tumores de mama como de melanomas.

Nuestro interés por el melanoma maligno (MM) surge a partir del hecho que es un tumor de incidencia creciente y de difícil tratamiento ya que en su forma diseminada es aún una enfermedad prácticamente incurable.

Para el estudio de la heterogeneidad tumoral resulta particularmente importante el establecimiento de nuevas líneas celulares, puesto que al avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares prevaecientes en el desarrollo y diferenciación de cada tipo tumoral podremos también encarar terapias más efectivas.

Recientemente hemos logrado establecer dos nuevas líneas celulares de melanoma humano, que se agregan a dos anteriormente establecidas de mama y melanoma respectivamente. Mediante la caracterización respectiva, han demostrado ser herramientas de gran utilidad en la ejecución de nuestros propositos, pudiendo además ser utilizadas en la caracterización de los anticuerpos monoclonales preparados en nuestro laboratorio. Por otra parte, las mismas amplían el espectro de Ags de melanoma con los que contamos, aumentando la posibilidad de encarar inmunoterapias efectivas con anticuerpos monoclonales (dirigidos contra melanoma) o con vacunas heterólogas preparadas con extractos celulares o células enteras de melanoma.

Algunos de los hallazgos realizados estudiando estas líneas celulares fueron la expresión diferencial de una proteasa (Catepsina D) en biopsias de melanomas humanos, nevos displásicos y nevos nevocelulares, sugiriéndose una asociación de la expresión de la misma con el desarrollo del melanoma.

Otro hallazgo realizado en las líneas celulares de melanoma fue la expresión de receptores atípicos para andrógenos, comprobándose esto también en biopsias

Cathepsin D in human primary melanomas, metastatic melanomas and preneoplastic nevi. Because of its expression in these lesions it may be associated with melanoma development.

Since melanoma tumors have demonstrated to be more aggressive in males, we also investigated the presence of androgen receptors that could stimulate tumor cells grown in the IIB-MEL-J cell line. We found an atypical androgen receptor probably mutated since it binds unspecifically other steroids hormones. Since this could be also demonstrated in human melanoma biopsies, the potential use of antiandrogen will be investigated for therapeutic protocols of human melanoma.

3) Gene therapy

This research project is developed in collaboration with the Kennedy Institute of Rheumatology, Department of Molecular Biology, London, England, whose Director is Dr. Yuti Chernajovsky.

Initial steps performed were the development of retroviral vectors containing various cytokine genes. We used retroviral transduction to introduce these genes into murine tumor cell lines (colon and melanoma), as a therapeutic alternative to in vivo cytokine administration. Modified cells were injected in syngeneic mice to induce tumors. Results showed a reduction in tumorigenicity of cells transduced with one of the cytokines. These experiments will be extended to other cytokines.

de melanomas humanos. Esto plantea una nueva perspectiva en cuanto a una probable terapia antiandrogénica de esta patología.

3) Terapia Génica

Esta parte de las investigaciones se realiza en colaboración con el Kennedy Institute of Rheumatology, Department of Molecular Biology, Londres, Inglaterra, cuyo Director es el Dr. Yuti Chernajovsky.

Los primeros pasos realizados involucraron el desarrollo de vectores retrovirales conteniendo genes de citoquinas y la posterior transferencia génica de los mismos a líneas celulares tumorales murinas de colon y melanoma, como ensayo de una alternativa terapéutica para la administración de citoquinas *in vivo*. Las células modificadas de esta forma se inocularon para producir tumores en ratones singeneicos. Los resultados obtenidos hasta el momento mostraron una fuerte reducción de la capacidad tumorigénica de las células que expresan una de las citoquinas transferidas. También se observó una inhibición de la capacidad invasiva *in vitro* de algunas de las células tumorales modificadas. Estos estudios se continuarán ampliando a otras citoquinas.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- J. Bustamante, L. Bredeston, G. Malanga and J. Mordoh: Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. **Pigment Cell Res.** 6 (1993) 348-353.
- 2- C. Ballaré, A.I. Bravo, V. Turchi, M. Nuti, R. Yomha, J. Schiaffi and J. Mordoh: Marker expression and differentiation in human breast cancer. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 698 (1993) 143-147.
- 3- J. Mordoh, S. Leis, A. Bravo, et al.: A new monoclonal antibody, FC-2.15, reacting with human breast cancer and other human neoplasia. **Int. J. Biol. Markers** 9 (1994) 125-134.
- 4- M. Nembrot, V. Morvillo and J. Mordoh: Analysis of the progesterone receptor gene in human breast tumors. **Tumor** 7 (1994) 73-77.
- 5- J. Mordoh, C. Silva, M. Albarellos, Bravo, A.I. and Kairiyama, C.: A Phase I clinical trial in cancer patients of a new monoclonal antibody, FC-2-15, reacting with tumor proliferating cells. **J. Immunother.** 17 (3) (1995) 151-160.

- 6- C. Kairiyama, I. Slavutsky, I. Larripa, V. Morvillo, A.I. Bravo, L. Bover, O.L. Podhajcer and J. Mordoh: Biologic, immunocytochemical and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. **Pigment Cell Res.** **8** (1995) 121-131.
- 7- V. Morvillo, I.A. Luthy, A.I. Bravo, M.I. Capurro, M. Donaldson, C. Quintans, R.S. Calandra and J. Mordoh: Atypical androgen receptor in the human melanoma cell line IIB-MEL-J. **Pigment Cell Res.** **8** (1995) 135-141.
- 8- O.L. Podhajcer, L. Bover, A.I. Bravo, M.F. Ledda, C. Kairiyama, I. Calb, L. Guerra, F. Capony and J. Mordoh: Characterization of cathepsin D expression in human malignant melanoma, dysplastic nevi and nevocellular nevi. **J. Invest. Dermatol.** **104** (1995) 340-344.
- 9- C. Ballaré, M. Barrio, P. Portela and J. Mordoh: Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells. **Cancer Immunol. Immunother.** **41** (1995) 15-22.
- 10- Y. Chernajovsky, G. Adams, O.L. Podhajcer, G. Mueller, P. Robbins and M. Feldman: Inhibition of transfer of collagen induced arthritis into SCID mice by gene transfer of spleen cells with retrovirus expressing soluble human tumor necrosis factor receptor. **Gene Therapy** **2** (1995) 731-735.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- 1- Laura Bover. Título: "Establecimiento de la línea celular IIB-BR-G como modelo para el estudio del carcinoma de mama humano" / "*Establishment of IIB-BR-G cell line as a model to study human breast carcinoma*". Julio de 1995. Director: J. Mordoh. Co-director: Dr. Eduardo Charreau.

PRESENTACIONES Y ASISTENCIA A CONGRESOS NACIONALES / PRESENTATIONS AND ATTENDINGS TO NATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS

- XXXVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Noviembre de 1993.
 - O.L. Podhajcer, L. Bover, A.I. Bravo, M.F. Ledda, C. Kairiyama y J. Mordoh: Caracterización de la expresión de la Aspartil Proteasa Catepsina D (Cat D) en melanoma humano.
 - V. Morvillo, Y. Luthy, M. Capurro, R. Calandra y J. Mordoh: Receptores androgénicos atípicos en melanoma humano.
 - M. Capurro, C. Ballaré, S. Adris y J. Mordoh: Expresión y caracterización del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal FC-2.15 en leucocitos polimorfonucleares humanos.
 - C. Kairiyama, I. Slavutsky, V. Morvillo, L. Bover, O.L. Podhajcer y J. Mordoh: Análisis biológico, antigénico y citogenético de una nueva línea celular de melanoma humano: IIB-MEL-IAN.
- XXIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), Villa Carlos Paz. Argentina. Octubre de 1993.
 - M.F. Ledda, L. Bover, J. Mordoh y O.L. Podhajcer: Expresión del gen codificante para la proteína de matriz extracelular SPARC en el proceso de invasión y metástasis del cáncer de mama y melanoma.

- XXXIX Reunión Científica de la SAIC, Noviembre de 1994.
 - C. Ballaré, M. Barrio, P. Portela y J. Mordoh: Efectos biológicos del anticuerpo monoclonal (AMC) FC-2.15 sobre células antígeno (Ag) 2.15-positivas. Caracterización de la unión Ag-AMC.
 - M.M. Barrio, A.I. Bravo, M. Donaldson, C. Quintans, D. Cymberknop, H. Vivante y J. Mordoh: Descripción del nuevo anticuerpo monoclonal (AMC) FC-5.01, reactivo con melanoma y carcinoma de mama humano e internalizable en vesículas intracitoplasmáticas.
 - J. Mordoh, C. Silva, M. Albarellos, A.I. Bravo y C. Kairiyama: Ensayo clínico de fase I en pacientes con cáncer de un nuevo anticuerpo monoclonal (AMC), FC-2.15 reactivo con células tumorales proliferantes.
 - V. Morvillo, I. Luthy, A.I. Bravo, M. Capurro, M. Donaldson, C. Quintans, R. Calandra y J. Mordoh: Acción biológica y detección de receptores de andrógenos en melanoma metastásico humano.
 - O.L. Podhajcer, L. Bover, M.F. Ledda, I. Bravo, S. Adris, M. Donaldson y J. Mordoh: Terapia génica en cáncer utilizando células tumorales modificadas por ingeniería de retrovirus para expresar citoquinas.
- XXX Reunión Anual de la SAIB, Noviembre de 1994.
 - O.L. Podhajcer, M.F. Ledda, L. Bover, S. Adris, I. Bravo, C. Quintans y J. Mordoh: Estudios sobre células tumorales modificadas mediante transferencia génica de citoquinas.
- XV Jornadas de Trabajos de la Asociación Argentina de Oncología Clínica, Buenos Aires, Argentina. Junio 1995.
 - J. Mordoh: Coordinador del Simposio sobre "Tratamientos Biológicos".
 - "Phase I Clinical Trial in cancer patients of a New Monoclonal Antibody FC-2.15 reacting with tumor proliferating cells."
 - "Análisis estadístico de una población de 143 pacientes con Melanoma".
- XL Reunión Científica de la SAIC, Noviembre de 1995.
 - M.F. Ledda, S. Adris, L. Bover, J. Schettini, J. Mordoh y O.L. Podhajcer: La expresión del c-DNA antisentido del gen SPARC anula la capacidad tumorigénica de células de melanoma humano.
- XXXI Congreso Nacional de la SAIB, Noviembre de 1995.
 - O.L. Podhajcer, M.F. Ledda, L. Bover, S. Adris, I. Bravo, M. Donaldson, J. Mordoh y Y. Chernajovsky: Transferencia génica de citoquinas en Terapia Génica de Cáncer.
 - M.F. Ledda, S. Adris, L. Bover, J.L. Schettini, J. Mordoh y O.L. Podhajcer: La expresión de la proteína de matriz extracelular SPARC se encuentra asociada al desarrollo del melanoma humano.

**PRESENTACIONES Y ASISTENCIA A
CONGRESOS INTERNACIONALES /
PRESENTATIONS AND ATTENDANCE
TO INTERNATIONAL SCIENTIFIC
MEETINGS**

- 84º Congreso de la American Association for Cancer Research (AACR), Orlando, USA. 1993.
 - C. Ballaré, A.I. Bravo, V. Turchi, M. Nuti and J. Mordoh: Marker-expression and differentiation in human breast cancer.
- 85º Congreso de la AACR, San Francisco, USA. 1994.
 - O.L. Podhajcer, L. Bover, A.I. Bravo, M.F. Ledda, L. Guerra, F. Capony, C. Kairiyama, I. Calb and J. Mordoh: Cathepsin D expression in malignant melanoma and benign nevi. Proceedings of the American Association for

Cancer Research, Vol: 35, p: 17, Abst.# 99, March 1994.

- J. Mordoh, S. Leis, A.I. Bravo, O.L. Podhajcer, C. Ballaré, M. Capurro, C. Kairiyama y L. Bover: Description of a new monoclonal antibody, FC - 2.15, reactive with human breast cancer and other human neoplasia. Proceedings of the American Association for Cancer Research, Vol: 35, p: 508, Abst.#3029, March 1994.

- J. Mordoh, C. Silva, M. Albarellos, A.I. Bravo and C. Kairiyama: A Phase I clinical trial in cancer patients with a new monoclonal antibody (MAb), FC-2.15. Proceedings of the American Association for Cancer Research, Vol: 35, p: 219, Abst.#1305, March 1994.

- J. Mordoh. 5º Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina. "Fronteras de la Medicina". Agosto de 1994. Conferencia plenaria.
- J. Mordoh. 1º Meeting Internacional de Inmunología, Centro Oncológico de Excelencia, La Plata, Argentina. "Inmunoterapia del cáncer", Septiembre de 1994.
- Congreso Internacional sobre Propiedad Intelectual auspiciado por la OMPI, Santiago de Chile, Chile. Septiembre 1994.
- 86º Congreso Anual de la AACR, Toronto, Canadá. Marzo de 1995.
 - M.F. Ledda, A.I. Bravo, L. Bover, S. Adris, J. Mordoh and O.L. Podhajcer: Expression of SPARC in melanoma and dysplastic nevi. Proceedings of the American Association for Cancer Research, Vol: 36, p:63, Abst.#374, March 1995.
 - V. Morvillo, I. Luthy, A.I. Bravo, M. Capurro, M. Donaldson, C. Quintans, R.S. Calandra and J. Mordoh: Atypical androgen receptor in the human melanoma cell line IIB-MEL-J and growth inhibition by antiandrogens. Proceedings of the American Association for Cancer Research, Vol: 36, p: 94, Abst. #561, March 1995.
- VI Congreso Mundial de Cáncer de Piel, Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 1995.
 - "Receptores Androgénicos en el melanoma humano". J. Mordoh; V. Morvillo.
 - "Inmunoquimioterapia en melanoma maligno".
- V Congreso Argentino de Cáncer de Mama, Buenos Aires, Argentina, Septiembre de 1995.
 - "Avances en la Biología del Cáncer de Mama". J. Mordoh. Conferencia plenaria.
- III Simposio Internacional de Farmacología y Terapéutica Oncológica, Buenos Aires, Argentina, Octubre de 1995.
 - "Anticuerpos Monoclonales en terapéutica". J. Mordoh. Conferencia plenaria.
- I Convención Educativa Latinoamericana de la European School of Oncology, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 1995.
 - "Simposio sobre Melanoma y Cáncer de Piel". J. Mordoh. Conferencia plenaria.

CONFERENCIAS Y SEMINARIOS /
LECTURES AND SEMINARS

Dr. José Mordoh

1993

- XV Reunión Anual de Dermatólogos Latinoamericanos del Cono Sur. Conferencia sobre "Oncogenes en Dermatología". Buenos Aires, Mayo.
- Jornadas de Actualización sobre Hormonoterapia en Cáncer. Conferencia sobre: "Diferenciación celular en cáncer de mama". Fundación Campomar, Junio.
- Mesa Redonda sobre: "Tratamiento de la metástasis hepática", Asociación Médica Argentina y Sociedad Argentina de Cancerología, Octubre.
- IX Jornadas Argentinas de Mastología. Conferencia sobre "Oncogenes y Marcadores Biológicos en cáncer de mama". Buenos Aires, Noviembre.
- Curso sobre "Estado actual sobre la respuesta al médico clínico ante la consulta oncológica", Conferencia sobre "Anticuerpos Monoclonales". Fundación Roux-Ocefa, Abril.
- Curso de Enfermería Oncológica. Conferencia sobre "Bioterapia". Organizado por el Instituto Alexander Fleming. Agosro.
- Curso Internacional sobre Biología y Patología del Melanocito. Sociedad Argentina de Patología, Buenos Aires, Julio.
- Director del Curso sobre Inmunoterapia y Terapias génicas. Aspectos básicos y aplicados. Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires. Del 27/9 al 4/11.
- "Respuesta inmune y cáncer". Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Noviembre.

1994

- I Jornadas de Ética Médica y Metodología de la Investigación Científica. Instituto Alexander Fleming, Capital Federal. Diciembre.
- XIV Jornadas Profesionales del Hospital Interzonal de Agudos Eva Perón. Noviembre.
- "Investigación en un Hospital Público".
- I Jornadas de la Asociación de Facultades de Ciencias Médicas de la República Argentina (AFACIMERA). Octubre.
- Curso de Oncología cutánea. Cátedra de Dermatología, Hospital de Clínicas José de San Martín, 18 de Agosto.
- Asociación Argentina del Cáncer, Buenos Aires, Argentina. 25 de Agosto.
- Director del Curso sobre Inmunoterapia y Terapias Génicas en el Cáncer. Aspectos Básicos y Aplicados, Instituto

Alexander Fleming. Del 12 de Septiembre al 20 de Octubre.

- "Anticuerpos monoclonales: uso terapéutico en Cancerología". Centro Gallego, Buenos Aires, 3 de Octubre.

1995

- XII Congreso Argentino de Oncología. Junio.
- I Jornadas Rioplatense de Oncología, Buenos Aires, Argentina. Junio.
- XV Jornadas de Trabajos de la Asociación Argentina de Oncología Clínica, Buenos Aires, Argentina. Junio. Coordinador del Simposio sobre "Tratamientos Biológicos".
- V Congreso Argentino y II Iberoamericano de Mastología, Buenos Aires, Argentina. Septiembre. "Avances en la biología del Cáncer de Mama".
- 10^{mo} Simposio de Ginecología Oncológica, Buenos Aires, Argentina. Agosto. Conferencia sobre "Oncogenes".
- X Jornadas Científicas de la Sanidad Policial, Buenos Aires, Argentina, Noviembre. Conferencia sobre "Terapias Génicas y enfermedades autoinmunes".
- Curso Post-Grado: "Porfirinas, Cáncer, Tratamientos y Terapia Fotodinámica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Octubre.
- Curso Anual de Formación en Mastología. Hospital Rivadavia, Octubre.
- Curso, "Terapias Génicas". Laboratorio Boehringer, Buenos Aires, Octubre.
- Curso "Melanoma Maligno. Nuevos Criterios Clínico-Terapéuticos", Instituto Alexander Fleming, del 6 al 30 de noviembre de 1995.

Divulgación

Dr. José Mordoh

- "Nuevos adelantos terapeuticos en cancer". (21/4/1993). Rotary Club Pilar-Recoleta.
- "Anticuerpos monoclonales y Cáncer". (22/4/1993). Petrolera San Jorge, Buenos Aires.
- "Biología del Cáncer". (14/7/1993) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- "Modernas terapias contra el cáncer" (23/9/1993). Asociación Universitaria Argentino-Norteamericana, Buenos Aires.
- "Modernas estrategias en la lucha contra el cáncer: Perspectivas para la próxima década". "Campomar Abierto", Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, 6/9/1994.

Dra. Laura Bover

1993

- Coordinadora del Curso sobre Inmunoterapia y Terapias Génicas en el cáncer. Aspectos Básicos y Aplicados. Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Septiembre.

1994

- Ateneo del Servicio de Ginecología del Hospital Rivadavia. Agosto.
- Coordinadora del Curso sobre Inmunoterapia y Terapias Génicas en el cáncer. Aspectos Básicos y Aplicados. Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Septiembre.

1995

- Disertante en el Curso de Mastología. Mayo. Asociación de médicos residentes de Obstetricia y Ginecología de Buenos Aires y la Sociedad Argentina de Ginecología y Obstetricia.
- Disertante en el XVº Congreso Argentino de Radiología. Diagnóstico por Imágenes y Terapia Radiante. Noviembre.

Dr. Osvaldo L. Podhajcer

1993

Curso sobre "Inmunología y terapias génicas. Aspectos básicos y aplicados". Organizado por el Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires.

"Genes of the extracellular matrix in breast cancer invasion and metastases". Organizado por el Kennedy Institute, Smith-Kline and Beescham, Londres, Reino Unido.

1994

- "Caracterización de genes involucrados en la invasión y metástasis del cáncer de mama". Organizado por INGEBI, Buenos Aires.
- Curso sobre "Inmunología y terapias génicas. Aspectos básicos y aplicados". Organizado por el Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires.
- "Caracterización de genes asociados a la invasión y metástasis en cáncer". Simposio "Biología Molecular" organizado en el marco de la XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Iguazú.

1995

- "The use of retroviral vectors for gene therapy of cancer". Simposio sobre "Biological Therapy of skin cancer", en el marco de The Sixth World Congress of Cancers of the Skin. Buenos Aires.
- "Terapia Génica". Curso de Postgrado "Avances Terapéuticos", organizado por El Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Buenos Aires.
- "El uso de vectores retrovirales en terapia oncogénica". Simposio sobre Terapia Génica organizado en el marco de la XL Reunión de la SAIC, Mar del Plata.
- "El uso de vectores retrovirales en terapia génica en cáncer". Congreso Internacional de Inmunología Clínica organizado por la SAI, Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires.
- "Anti-tumorigenic effects of IL-10 transduced tumor cells". Charing Cross Hospital, London, Reino Unido.
- Organizador de las 1eras. Jornadas de Terapia Génica. Desarrollo y avances en la Argentina. Realizada el 25 de octubre en el Auditorio de la Fundación Campomar.

CARGOS DOCENTES

Dr. José Mordoh

- Sub-Director del Curso para Especialistas en Oncología dependiente de la Facultad de Medicina, UBA, dictado en el Instituto Alexander Fleming.

DISTINCIONES

Dr. José Mordoh

- Miembro del Comité de Selección para Estudiantes de la Asociación Argentina del Instituto Científico Weizmann. 1993.
- Miembro Titular de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. (Desde 1993).
- Miembro Titular del Jurado para la disciplina: "Bioquímica" (Orientación Patología Molecular), de la Universidad Nacional de Tucumán. 1993.

VIAJES REALIZADOS / TRAVELS ABROAD

Dr. José Mordoh

American Association for Cancer Research. Annual Meetings. May 1993, 1994 and 1995. U.S.A.

Lic. en Bioquímica Claudia Kairiyama

- Grant from the Japan International Cooperation Agency. Pharmaceutical Sciences. Dpt. of Radiopharmacy. Kyoto University. Japan. Since November 18th 1992 up to February 18th 1993. Director: Dr. A.Yokoyama.

Dr. Osvaldo Podhajcer

- American Association for Cancer Research. Annual Meeting. Mayo de 1994. / *May 1994.*
- Kennedy Institute of Rheumatology. Dpt. of Molecular Biology. London. England. Desde 1º de junio hasta el 28 de julio de 1993. (Since June 1st up to July 28th 1993). Director: Dr. Y.Chernajovsky.
- Congreso sobre "Gene Therapy of Cancer in Europe", Viena, Austria, 1995.

VISITANTES EXTRANJEROS/ FOREIGN VISITORS

- Dr. Y. Chernajovsky. De / *from:* Kennedy Institute of Rheumatology. Dept. of Molecular Biology. London. England. Octubre 1995 (October 1995).

SUBSIDIOS /GRANTS

- ICGEB-UNIDO (ONU). Desde marzo de 1992 hasta marzo de 1995 / *Since March 1992 up to March 1995.* Dr.José Mordoh.
- CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas / *National Research Council - Argentina*). Agosto de 1993 / Agosto 1994 / *August 1993 / August 1994.* Dr. O.L. Podhajcer.
- Fundación para la investigación y prevención del Cáncer (FUCA). Dr. José Mordoh y Dr. Podhajcer. 1995 por 1 año / *for 1 year.*
- Fundación Roemmers (Argentina). Dr. O.L. Podhajcer. Agosto de 1995 (1 año).
- Fundación Roemmers (Argentina). Lic. Morvillo. Agosto de 1995 (1 año).
- Laboratorios Gador al Dr. Podhajcer para participar del Congreso sobre "Gene Therapy of Cancer in Europe", Viena, Austria, 1995.
- London Royal Society and ICRETT from the UICC. Dr. Podhajcer. Para viajes. 1993.
- Fundación Sales al Dr. Podhajcer para participar del Congreso Anual de American Association for Cancer Research, San Francisco, USA, 1994.
- The British Council y Fundación Antorchas. Dr.Podhajcer. Para viajes. 1995 por 3 años (*for 3 years*).

PREMIOS / AWARDS

- Premio "40 Aniversario de las Reuniones de SAIC". Mejor trabajo del congreso: "La expresión del c-DNA antisentido del gen SPARC anula la capacidad tumorigénica de células de melanoma humano". Noviembre 1995. / "40 Anniversary of Scientific Meetings of Argentine Society of Clinical Investigation" Award (SAIC) to the work "Antisense c-DNA expression of SPARC gene abrogated tumorigenic ability of human melanoma cells". November 1995.

Lab 102

**Bioquímica y Biología Molecular del
desarrollo**

*Developmental Biochemistry and Molecular
Biology*

Personal Permanente / Permanent Staff

Luis A. Quesada-Allué

Tesistas / Ph.D. Students

Pablo Wappner (Becario UBA / Univ. Bs. As. Fellow)

Alejandro Rabossi (Becario / CONICET Fellow)

Belén Cadenas (Becaria Min. Salud / Fellow, Health Min.)

Ariane Sonvico (Becaria UBA / Univ. Bs. As. fellow)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Fabiola Parussini (hasta / until 1994) (Becaria UBA / Univ. of Bs.As.
fellow)

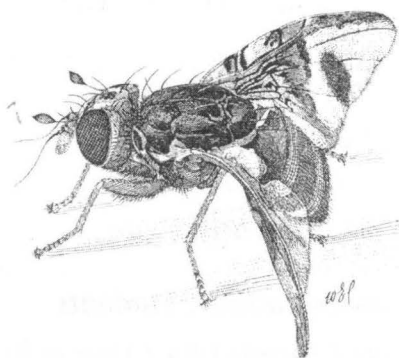
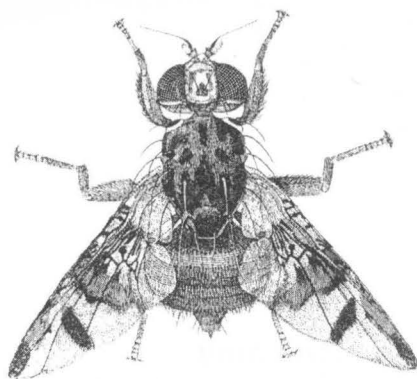
Antonia Marin Burgin (hasta / until 1994)

Martín Pérez

Laura Ación

Estudiantes Extranjeros Visitantes / Foreign Visiting Students

Florencia Cavodeassi (Universidad Autónoma de Madrid)
(Winter visitor, 1995)



Ceratitis capitata

ASPECTOS MOLECULARES DE LA MORFOGENESIS Y DIFERENCIACION EN LOS INSECTOS

En el desarrollo eucariótico resulta clave la identificación de reacciones bioquímicas involucradas en la morfogénesis de órganos y la diferenciación de tejidos. Nuestro objetivo es la detección de genes de función bioquímica conocida que se expresan en etapas clave del desarrollo; haciéndolo en forma tejido-específica y/o tiempo-específica. Durante los últimos años hemos utilizado enfoques biológico-moleculares, bioquímicos y fisiológicos para estudiar diferentes aspectos de la metamorfosis en los insectos. (Con un enfoque similar hemos realizado también el estudio de algunas etapas de la embriogénesis somática en plantas). Durante el período se han enfatizado los estudios sobre la síntesis de glicoconjugados y sobre el metabolismo de catecolaminas. Los principales proyectos fueron:

1) Eventos moleculares durante la metamorfosis en insectos

Hemos estudiado, durante la metamorfosis de *Ceratitis capitata*, la correlación entre eventos tempranos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Este insecto, la Mosca Mediterránea de la fruta, es una importante peste de los frutales. El "disparo", dependiente de ecdisteroides, de algunos de estos fenómenos de diferenciación, ha sido también investigado. Se ha puesto especial énfasis en la caracterización de proteasas que se activan durante la pupariación y estarían involucradas en la histólisis de tejidos larvales. Se han realizado estudios relacionados en otros insectos como *Drosophila melanogaster* y la "vinchuca", *Triatoma infestans*, reduído chupador de sangre, vector de la enfermedad de Chagas; también en otros invertebrados.

2) Esclerotización de la cutícula en los insectos

Se estudió la formación, pigmentación y esclerotización del pupario de la Mosca Mediterránea como modelo

MOLECULAR ASPECTS OF INSECT MORPHOGENESIS AND DIFFERENTIATION

A major problem in eucaryotic development is the identification of biochemical steps leading to organ morphogenesis and tissue differentiation. During the last years, we have been using physiological, biochemical and molecular biology approaches to study several aspects of insect metamorphosis. Our overall aim is to detect tissue- and time-specific expression of genes that are involved in critical steps of development and whose biochemical function is known. (With a similar approach we have studied certain aspects of somatic embryogenesis in plants). Studies on glycoconjugate synthesis and on catecholamine metabolism are emphasized. Main projects during the reported period were:

1) Molecular events during insect metamorphosis

We have studied the correlation between early morphological, physiological and biochemical events during the metamorphosis of an important orchard pest, the Mediterranean fruit fly (Medfly) *Ceratitis capitata*. The ecdysone-dependent triggering of a number of differentiation phenomena was investigated. A strong emphasis was put in the molecular characterization of proteases activated during pupariation, eventually involved in histolysis. Related comparative studies were carried out in other insects as *Drosophila melanogaster* and the blood sucking bug *Triatoma infestans* (vector of the American trypanosomiasis, Chagas disease) as well as in other invertebrates.

2) Insect cuticle sclerotization

Medfly puparium formation, pigmentation and sclerotization was studied as a model of terminal differentiation of a cuticle structure. We have been able to define general metamorphosis "programs" (pupariation, pupation) that in turn imply the activation of restricted, partially overlapping, tissue-specific "subordinate programs" (cuticle components synthesis, sclerotization,

de diferenciación terminal de una estructura cuticular. Hemos podido definir "programas" generales de la metamorfosis (pupariación, pupación) que a su vez implican la activación de "programas subordinados" tejido-específicos, de expresión restringida en el tiempo y parcial superposición (síntesis de componentes cuticulares, esclerotización, síntesis de pterinas y pteridinas, etc). Hemos establecido los roles de la B-alanina y de la dopamina en la pigmentación del pupario: el exceso de estos metabolitos genera respectivamente puparios marrones (tipo salvaje) o negros (tipo mutante). Un programa de colaboración relacionado con estos estudios ha sido establecido con el grupo de la Dra. Manso, del Instituto de Genética, CICA-INTA y con los Dres. Karl Kramer y Theodore Hopkins, del Laboratorio de Granos del ARS, Departamento de Agricultura Norteamericano y de la Universidad de Kansas, respectivamente. El objetivo de este programa es caracterizar a nivel genético y molecular varios mutantes. Por medio de la técnica de PCR se generaron bandas diagnósticas de ADN y perfiles de ADN amplificado polimórfico para los mutantes de laboratorio y para poblaciones Argentinas de *Ceratitis capitata*. Se encuentran en desarrollo estudios sobre la síntesis de intermediarios catecolamínicos involucrados en la esclerotización/pigmentación y de nuevos derivados de β -alanina.

3) Antígenos de *Triatoma infestans*

Se han realizado estudios de antígenos cuticulares (externos) e intestinales (internos). Una de las metas ha sido la identificación de una proteína de triatomíneo capaz de generar anticuerpos citotóxicos en vertebrados huéspedes que puedan dañar las células del intestino (u otro órgano); constituyéndose así en posibles inmunógenos para vacunas.

4) Biosíntesis de quitina y glicoproteínas en la cutícula de insectos

pterine and pteridine synthesis, etc). We have established the role in puparium pigmentation of B-alanine and dopamine: excess of these metabolites generates respectively brown (wild type) or black (mutant) puparia. A related joint program was established with the Genetics group of the INTA (Argentine National Institute of technological Agronomy) and with Drs. Karl Kramer and Theodore Hopkins, (respectively from the US Grain M. Res. Lab, ARS USDA, and from the Kansas State University), to study phenotype mutants of the Medfly. Several mutants were genetically and biochemically characterized. PCR-generated DNA diagnostic bands and polymorphic amplified DNA profiles for laboratory mutants and Argentine populations of Ceratitis capitata were also obtained.

Studies on the synthesis of catecholamine intermediates involved in sclerotization/pigmentation and of novel β -alanine derivatives synthesis are under way.

3) *Triatoma infestans* antigens

A study of (external) cuticle antigens and (internal) gut antigens was carried out. One of the main goals was the identification of a triatomine protein able to generate cytotoxic antibodies in host vertebrates that might damage the gut (or other) when ingested; therefore being suitable as putative vaccine immunogen.

4) Chitin and (glyco)protein biosynthesis in insect cuticle

Studies on the biosynthesis of chitin (poly-N-Acetylglucosamine) and of cuticle (glyco)proteins during the development of the Medfly and other insects aim at the identification of the involved enzymes and of the regulatory aspects of cuticle formation. The synthesis, export time, deposition and characteristics of PCG-100, the main cuticle glycoprotein of Ceratitis, have been studied in detail whereas the cloning of the gene and the expression studies are under way. Physicochemical and rheological properties of chitin and chitin derivatives are also studied.

Los estudios sobre la biosíntesis de quitina (poly-N-Acetilglucosamina) y de (glico)proteínas de cutícula durante el desarrollo de la Mosca del Mediterráneo y otros insectos apuntan a la identificación de las enzimas involucradas y de los aspectos regulatorios de la formación cuticular. Se ha estudiado en detalle la síntesis, tiempo de exportación, deposición y características de la PCG-100, principal glicoproteína cuticular de *Ceratitis*; en tanto que progresa el clonado del gen y el estudio de su expresión. También se estudian propiedades físico-químicas y reológicas de la quitina y derivados de quitina.

5) Aspectos bioquímicos de la diferenciación *in vitro* en plantas

La planta-modelo experimental es la zanahoria común, *Daucus carota*. Originalmente se pretendió comprender el rol aparente de sustancias glicosiladas durante la organogénesis y embriogénesis somática de células de zanahoria cultivadas en medios líquido y/o semi-sólido. El proyecto de colaboración bi-nacional con los Dres. Lo Schiavo y Terzi (Universidad de Padua, Italia) enfatizó los estudios en fosforilación y glicosilación de embriones somáticos. Como consecuencia de estos estudios, se describió por primera vez en los eucariotes la biosíntesis de un nuevo esterol-xilósido.

5) Biochemical aspects of *in vitro* differentiation in plants

Our experimental model-plant is the edible carrot, *Daucus carota*. We originally wanted to understand the apparent role of glycosylated substances during organogenesis and somatic embryogenesis of carrot cells cultured in liquid and/or semi-solid culture media. A binational, collaborative project with Drs. F. Lo Schiavo and M. Terzi, (University of Padova, Italy), emphasized the studies on phosphorylation and glycosylation in somatic embryos. During these studies, the biosynthesis of a novel sterol-xyloside was described for the first time in eucariotes.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- A. Rabossi y L.A. Quesada-Allué: Medfly eye pigments as markers of differentiation. **Anales de la Asociación Química Argentina** **81** (1993) 325-332.
- 2- L.A. Quesada-Allué, K. Hagelin, y F. LoSchiavo: Xylose transfer to endogenous lipids in tissue-cultured cells and somatic embryos of *Daucus carota*. **Phytochemistry** **33** (1993) 1347-1357.
- 3- P. Wappner y L.A. Quesada-Allué: Cuticle proteins from abdomens of *Triatoma infestans* nymphs. **Anales de la Asociación Química Argentina** **81** (1993) 111-116.
- 4- L.A. Quesada-Allué, A. Rabossi y P.Wappner: Introducción a *Ceratitis* y cría en el laboratorio. En **La Mosca del Mediterráneo, Guía de laboratorio** (Quesada Allué ed.) (1994). Lab. Bioquim. Des. Fundac. Campomar, Buenos Aires.

- 5- E. Guillén, L.A. Quesada-Allué, y R.A. Couso: UDP-N-Acetylglucosamine:Glycoprotein N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase activity in pupae of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.** **24** (1994) 213-219.
- 6- G.B. Boccaccio y L.A. Quesada-Allué: Synthesis and deposition of PCG-100, the main Pupal Cuticle Glycoprotein of the Medfly *Ceratitis capitata*. **Arch. of Insect Biochem. Physiol.** **27** (1994) 217-234.
- 7- P. Wappner, A. Rabossi, G.L. Boccaccio y L. A. Quesada-Allué: Métodos de interés utilizados en *Ceratitis*. En: **La Mosca del Mediterráneo, Guía de laboratorio** (Quesada-Allué ed.) (1994). Lab. Bioquim. Des. Fundac. Campomar, Buenos Aires.
- 8- A. Sonvico, F. Manso y L.A. Quesada-Allué: Identification of mature and immature stages of fruit flies (*Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus*). **Tech. Notes Mol. Insect. Science** **1** (1994) 10-20.
- 9- A. Rabossi, L.A. Quesada-Allué y P. Wappner: Desarrollo de *Ceratitis*. En: **La Mosca del Mediterráneo, Guía de laboratorio** (Quesada Allué ed.) (1994). Lab. Bioquim. Des. Fundac. Campomar, Buenos Aires.
- 10- P. Wappner, K. Kramer, T.L. Hopkins, M. Merritt, J. Schaefer y L.A. Quesada-Allué: *White Pupa*: A *Ceratitis capitata* Mutant lacking Catecholamines for Tanning the puparium. **Insect. Biochem. Molec. Biol.** **25** (1995) 365-374.
- 11- L.A. Quesada-Allué, B. Cadenas, K. Hagelin, F.Guzzo y F. LoSchiavo: Changes in the synthesis of unusual glycolipids during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. In: **Plant Lipid metabolism**, pp. 242-246, J.C. Kader and P. Mazliak, eds. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, Netherlands (1995).
- 12- A. Rabossi y L.A. Quesada-Allué: Temporal correlation of metamorphosis events in *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata*. **Drosophila Information Service** **76** (1995) 148-149.
- 13- L.A. Quesada-Allué y D. Gitlin: Scientific output in Argentina 1966-1983. **Scientometrics** **34** (1995) 27-35.
- 14- L.A. Quesada-Allué, P. Wappner, G.L. Boccaccio y A. Rabossi: Metamorphosis in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). In: **Fruit Fly Pests** (Steck, J.G. and McPheron, B.A. eds.) (1995) St.Lucie Press, Delray B. FL.
- 15- M.A. Pedrera, B. Dimant, D. Tomsic, L.A. Quesada-Allué y H. Maldonado: Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the Crab *Chasmagnatus granulata*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **52** (1995) 386-395.

PRESENTACIONES POR INVITACION EN
CONGRESOS / INVITED PRESENTATIONS
IN SCIENTIFIC MEETINGS

- Fourth International Fruit Fly symposium, Sand Key, Florida , June 5 to 10, 1994. "Larva to pharate adult transformation in the Medfly".
- Technical Meeting on the advances in Medfly eradication, Mendoza, Argentina., 20-22 Octubre de 1994. "Metamorphosis in the Medfly".

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS / COMMUNICATIONS IN
SCIENTIFIC MEETINGS**

- Second International Symposium on Molecular Insect Science; Flagstaff, Arizona, USA, 1993.
 - P. Wappner, T.L. Hopkins, K. Kramer y L.A. Quesada-Allué: Puparium tannification in several strains of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*.
 - A. Rabossi, P. Wappner, G.L. Boccaccio y L.A. Quesada-Allué: Molecular markers during metamorphosis of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*.
- IV Congreso Regional de Protozoología; Catamarca, Argentina, 1993.
 - F. Parussini, P. Wappner, A. Rabossi, A. Marin Burgin, C. Bais y L.A. Quesada Allué: Antígenos de *Triatoma infestans* de interés aplicado.
- XXIX Reunión Anual de la SAIB; Carlos Paz, Cordoba, Argentina, 1993.
 - P. Wappner, T.L. Hopkins, K.J. Kramer y L.A. Quesada Allué: Metabolismo de las Catecolaminas involucradas en la estabilización de la cutícula de los insectos.
- XXIV Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Argentino-Uruguayas de Genética, Posadas, Misiones, 1993.
 - L.A. Quesada -Allué: Definición de especie: Aportes de la ciencia de los insectos.
- XX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal; San Carlos de Bariloche, Argentina, 1993.
 - L.A. Quesada-Allué, B. Cadenas, K. Hagelin y F. LoSchiavo: Transferencia de xilosa a lípidos endógenos durante la embriogénesis somática de zanahoria.
- Fourth International Symposium on fruit flies of economic importance, Sand Key, Florida, USA, 1994.
 - L.A. Quesada-Allué, P. Wappner, G.P. Boccaccio y A. Rabossi: Larva to pharate Adult transformation in the medfly.
- VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, Italia, 1994.
 - L.A. Quesada-Allué, A. Sonvico, F. Guzzo y F. LoSchiavo: Glycoconjugate biosynthesis during somatic embryogenesis in the carrot, *Daucus carota*.
- Fourth International Congress of Plant Molecular Biology; Amsterdam, Holanda, 1994.
 - L.A. Quesada-Allué, B. Cadenas, A. Sonvico, F. Guzzo, P. Mariani, M. Terzi y F. LoSchiavo: Changes in the synthesis of glycoconjugates during somatic embryogenesis in *Daucus carota*.
- 11th International Meeting on Plant Lipids; Paris, Francia, 1994.
 - L.A. Quesada-Allué, B. Cadenas, K. Hagelin, F. Guzzo, M. Terzi y F. LoSchiavo: Changes in the synthesis of unusual glycolipids during somatic embryogenesis in *Daucus carota*.
- XXX Congreso de la SAIB; Iguazú, Argentina, 1994.
 - P. Wappner, K.J. Kramer, T.L. Hopkins, M. Merrit, J. Schaefer y L.A. Quesada: *White pupa*, primer mutante cuticular en insectos.
- 1st. Meeting of the Slovenian Biochemical Society; Portoroz, Eslovenia, 1995.
 - V. Stoka, A. Rabossi, V. Puizdar, A. Ritonja, L.A. Quesada-Allué y V. Turk: Isolation of cysteine proteinases from pupae of the Medfly.

- Iller Congreso Argentino de Entomología, Mendoza, Argentina, 1995.
 - A. Rabossi y L.A. Quesada-Allué: Histólisis de tejidos larvales durante la metamorfosis de la mosca del mediterráneo.
 - A. Sonvico, F. Manso y L.A. Quesada-Allué: Caracterización de polimorfismos en poblaciones de moscas de los frutos (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*).
- XXXI Congreso de la SAIB, Villa Giardino, Argentina, 1995.
 - A. Sonvico, F. Manso y L.A. Quesada-Allué: Caracterización de poblaciones de moscas de los frutos (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*).
 - P. Wappner, M. Pérez, M. Bravo y L.A. Quesada-Allué: Una nueva actividad enzimática fundamental para la esclerotización de la cutícula de los insectos.
 - A. Rabossi, V. Stoka, V. Puizdar, F. Cavodeassi, D. Berman, L. Maréchal, V. Turk y L.A. Quesada-Allué: Degradación de tejidos larvales durante la metamorfosis de la mosca del mediterráneo.

DOCENCIA / TEACHING

- Carrera de Ciencias Biológicas, Universidad de Luján / *School of Biological Sciences, University of Luján*.
 Biología del Desarrollo, segundo semestre 1994-1995 / *Developmental Biology, second quarter 1994-1995*.
 Director invitado y profesor ad honorem / *Invited Director and ad honorem professor*: Dr. Luis A. Quesada Allué.
 Docentes auxiliares / *Assistant professors*: Lic. P. Wappner (1994-1995), Lic. A. Rabossi (1995).

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- Pablo Wappner. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas: "Mecanismos moleculares involucrados en la esclerotización de la cutícula de los insectos" / *"Molecular mechanisms involved in the sclerotization of insect cuticle"*. Calificación: Sobresaliente. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 1995.

TESINAS DE LICENCIATURA / MASTER DISSERTATIONS

- Fabiola Parussini. Tesina (Seminario) de Lic. en Ciencias Biológicas: "Caracterización de (glico) proteínas del tracto digestivo de la 'vinchuca' *Triatoma infestans* y estudio de antígenos potencialmente reconocidos por anticuerpos con propiedades citotóxicas". / *"Characterization of gut (glyco) proteins in the blood-sucking bug Triatoma infestans and study of antigens as potential targets of cytotoxic antibodies"*. Calificación: Sobresaliente. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 1994.

**ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE
PROMOCION DE LA CIENCIA Y LA
EDUCACION SUPERIOR /
PARTICIPATION IN SCIENCE AND
EDUCATION PROMOTING
ACTIVITIES**

Dr. Luis A. Quesada Allué

- Cátedra UNESCO-UBA de Bioética / *UNESCO-UBA Chair in Bioethics*. Miembro del Consejo asesor (en representación de la Facultad de Ciencias Exactas) / *Council member (School of Sciences representative)* (1993-1994)- Cátedra UNESCO-UBA de Bioética / *UNESCO-UBA Chair in Bioethics*. Miembro del Consejo Científico / *Member of the Scientific Council* (1995).
- Proyecto FOMECE/Banco Mundial / *Project FOMECE/World BANK*: Coordinador: "Proyecto de mejora de la enseñanza de la Química Biológica y Biología Molecular en las Carreras de Grado y de Post-Grado en Ciencias Químicas y en Ciencias Biológicas". FOMECE CBI/EX 1026/F 379. 1995. / *Coordinator: "Project to improve the teaching in Biochemistry and Molecular Biology for undergraduates and graduates in Chemistry and in Biological Sciences"*.

SUBSIDIOS / GRANTS

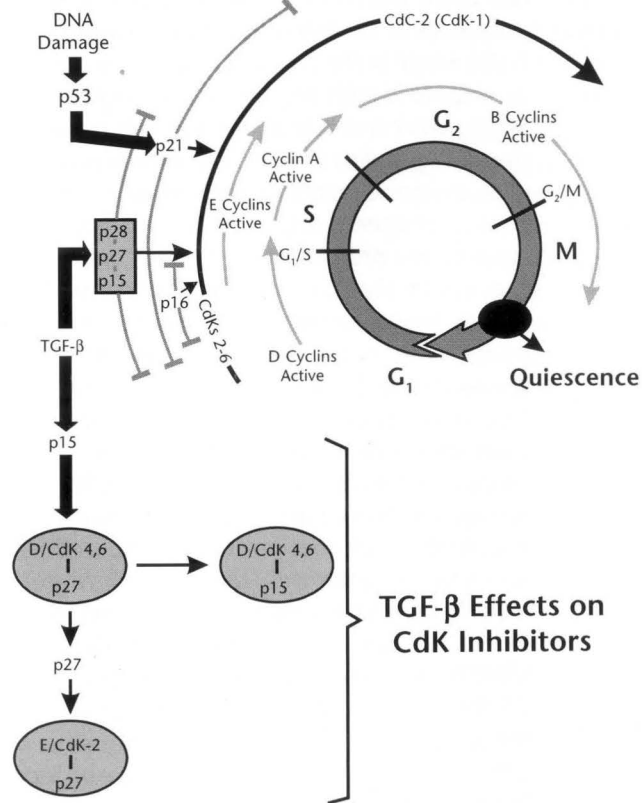
- Universidad de Buenos Aires / *University of Buenos Aires* 1993-1995.
- CNR (Italy), 1994.
- WHO (Switzerland), 1993.
- YPF SA.

Lab 104

Laboratorio de Señalización Molecular

Molecular Signalling Laboratory

Cell Cycle Progression Control



TGF-β Effects on
CdK Inhibitors

A general scheme of signalling molecules exerting cell cycle control from Karp, J. and Broder, S.; "Nature Medicine" Vol 1; número 4; pag. 309-320; (1995).

Personal Permanente / Permanent Staff

Luis Jiménez de Asúa M.D., Ph.D., MRCPATH (UK)

Becarios Post-Doctorales / Post-Doctoral Fellows

Mercedes Goin

Marcelo Luis Rodríguez (desde Marzo / since March 1995)

Tesistas / Ph.D Students

Marcela B. Ortiz (hasta Septiembre / until September 1995)

Moirá Sauane

María Belén Cadenas (desde Enero / since January 1995)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

María B. Gómez de Alzaga

Carolina Schere Levy (desde Junio / since June 1995)

El paso de las células de mamíferos a través del ciclo celular ocurre vía la activación secuencial de moléculas regulatorias, que controlan los eventos cruciales de dicho ciclo. Estos procesos celulares están regulados externamente por factores de crecimiento y hormonas, que actúan mediante mecanismos de señales complejos. Nuestro esfuerzo está dirigido a explicar cómo las redes de señales mitogénicas y no mitogénicas, controlan la actividad de moléculas claves que se encuentran en las transiciones de las fases G_0/G_1 y G_1/S del ciclo celular, en células de mamíferos. Las células de ratón suizo 3T3 poseen las mismas propiedades de las células normales tales como el cese de división en la transición G_0/G_1 del ciclo celular. De esta manera, ellas representan un modelo ideal en el cual se pueden identificar los mecanismos claves que regulan la división celular. Trabajos recientes ponen de manifiesto que en estas células, las señales para la inducción de la proliferación difieren entre los factores de crecimiento, tales como prostaglandinas y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) induce aumentos tempranos en el contenido de diacilglicerol (DAG) y la activación de quinasas de proteínas C (PKC), ambos efectos son requeridos para la respuesta mitogénica de la misma. El aumento en la actividad de PKC provoca incrementos en la tasa celular de entrada en la fase S, luego de una fase G_1 de duración constante. Si bien las prostaglandinas E_1 o E_2 (PGE_1 ó PGE_2), y la insulina no actúan vía la activación de PKC, ellas son capaces de potenciar la tasa de entrada a la fase S dependiente de $PGF_{2\alpha}$. De esta manera, parece que el proceso por el cual la célula inicia la replicación del ADN puede ser regulada vía varios procesos independientes de señalización. En contraste, EGF no dispara la actividad de PKC, a pesar de causar una respuesta proliferativa. Otros trabajos revelan que la $PGF_{2\alpha}$ requiere eventos señalizantes adicionales a la activación de la PKC para despertar la respuesta mitogénica. Hemos demostrado que la $PGF_{2\alpha}$ puede también disparar una rápida

Mammalian cell progression through the cell cycle occurs via the sequential activation of key regulatory molecules controlling crucial events. These cellular devices are externally regulated by growth factors and hormones acting through a complexity of signalling mechanisms. Our endeavour is to unravel, in mammalian cells, how the mitogenic and non-mitogenic signalling networks control the activity of key molecules underlying G_0/G_1 and G_1/S cell cycle transitions. Swiss mouse 3T3 cells possess properties of normal cells such as ceasing to divide at the G_0/G_1 stage of the cell cycle. Thus, they are an ideal model in which to identify key mechanisms regulating cell division. Recent work reveal that in these cells growth factors such as prostaglandins as well as epidermal growth factor (EGF) differ in signals underlying proliferation. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) triggers early increases in diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activation, which are required for the $PGF_{2\alpha}$ mitogenic response. Enhancing PKC activity causes increases in the rate of cellular entry into S phase after a G_1 phase of constant length. Neither prostaglandin E_1 or E_2 (PGE_1 or PGE_2) nor insulin, act via PKC activation but they only potentiate the $PGF_{2\alpha}$ -dependent rate of entry into S phase. Thus, it appears that the process by which cell initiate DNA replication can be regulated via various independent signalling processes. In contrast, EGF does not trigger PKC activity but causes proliferative response. Further work reveal that $PGF_{2\alpha}$ requires from additional signalling events to PKC activation to elicit mitogenesis. We showed that $PGF_{2\alpha}$ also can trigger rapid tyrosine phosphorylation (TP) of a protein of about 75 Kd (Goin). This event can occur via two separate processes. One involves direct tyrosine kinase (TK) activation whilst the other does involve an indirect process involving PKC-dependent events. The latter can either reflect a PKC-mediated TK activation or tyrosine phosphatase inhibition or both (Jiménez de Asúa & Goin). Both $PGF_{2\alpha}$ or EGF action requires mevalonate synthesis because lovastatin a competitive inhibitor of the Hydroxyl Methyl Glutaryl CoA reductase (HMGCoA reductase) block both mitogens to induce DNA synthesis. Such inhibitory

fosforilación en tirosina (TP) de una proteína de 75 Kd, aproximadamente (Goin). Este evento puede ocurrir vía dos procesos separados. Uno involucraría la activación directa de una quinasa de proteínas en tirosina (PTK), mientras que en el otro intervendría un proceso indirecto involucrando eventos dependientes de PKC. Este último puede reflejar tanto una activación de PTK mediada por PKC o una inhibición de una fosfatasa en tirosina, o ambas (Jiménez de Asúa y Goin). La lovastatina, un inhibidor competitivo de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGCoA reductasa), bloquea las acciones mitogénicas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y EGF, demostrando que la inducción de la síntesis de ADN por ambos mitógenos requiere la síntesis de mevalonato. Dicho efecto inhibitorio sólo puede ser revertido por mevalonato, pero no por dolicoles de cadenas variables, colesterol o ubiquinona (Goin, Ortiz y Jiménez de Asúa). Además la lovastatina bloquea la incorporación de manosa en los primeros pasos de la N-glicosilación de proteínas (Ortiz). Estos hallazgos sugieren que dichos mitógenos requieren una activación temprana de la HMGCoA reductasa, que lleva a una rápida síntesis de mevalonato y su conversión a derivados isoprenilos. Estos últimos se sabe que están involucrados en las modificaciones post traduccionales de las proteínas que son requeridas para señalar la multiplicación celular.

El estudio de la acción de las señales disparadas por el factor de transformación y crecimiento β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$) revelan que dispara dos efectos diferentes dependiendo del estado de la PKC dentro de las células. En las células que poseen una PKC intacta, el $\text{TGF-}\beta_1$ sólo incrementa la mitogénesis inducida por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y aumenta la máxima respuesta proliferativa de esta última. La insulina también aumenta el crecimiento dependiente de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, pero en presencia de $\text{TGF-}\beta_1$ sólo potencia aún más la respuesta de $\text{PGF}_{2\alpha}$, si el primero se encuentra a baja concentración (Jiménez de Asúa y Gómez de Alzaga). En concentraciones altas de $\text{TGF-}\beta_1$, la insulina no puede ejercer dicho efecto. Sin embargo, a niveles

effect can only be reversed by mevalonate but not by dolichols of variable length, cholesterol or ubiquinone (Goin, Ortiz & Jiménez de Asúa). Even more lovastatin did not block mannose incorporation into nascent N-glycosylated proteins (Ortiz). These findings suggests that these mitogens require early activation of HMGCoA reductase leading to both rapid mevalonate synthesis and to its conversion into isoprenil derivatives. The latter are known to be involved in postransductional protein modifications which are required to signal cell multiplication.

Studies on $\text{TGF}\beta_1$'s signals action reveal that $\text{TGF}\beta_1$ elicits two different effects depending upon the state of PKC within the cells. In cells possessing intact PKC, $\text{TGF}\beta_1$ only enhances $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced mitogenesis reducing the $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dose dependency and increasing $\text{PGF}_{2\alpha}$ maximal proliferative response. Insulin also increased $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent growth, but only at lower $\text{TGF}\beta_1$ concentrations did further potentiate the $\text{PGF}_{2\alpha}$ response. (Jiménez de Asúa & Gómez de Alzaga). At higher $\text{TGF}\beta_1$ levels, insulin cannot exert such an effect. However, at high $\text{TGF}\beta_1$ levels, insulin does increase $\text{PGF}_{2\alpha}$ -triggered-protein synthesis-dependent glucose uptake (Gómez de Alzaga & Jiménez de Asúa). $\text{PGF}_{2\alpha}$ action in presence of $\text{TGF}\beta_1$ is not enhanced by PGE_1 . Such a lack of a PGE_1 effect, it is not dependent upon $\text{TGF}\beta_1$ -mediated PGE_1 synthesis. $\text{TGF}\beta_1$ does neither triggers DAG increases nor cause PKC activation. Yet, $\text{TGF}\beta_1$ complements PKC and PTK-dependent events to induce entry into S phase. Both insulin, PGE_1 or the combination of both only causes mitogenesis with 1-Oleoyl-2-acetyl glycerol, a DAG analogue and PKC activator. Nevertheless, insulin, though not PGE_1 nor combination of $\text{TGF}\beta_1$ and PGE_1 induced DNA synthesis, but $\text{TGF}\beta_1$ plus insulin caused proliferation, which was further enhanced by PGE_1 . These findings strongly suggest that $\text{TGF}\beta_1$ and insulin act via separate signalling mechanisms (Gómez de Alzaga, Goin & Jiménez de Asúa).

We have also shown that in cells with 12-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA) induced-PKC down modulation,

altos de TGF- β_1 , la insulina potencia el transporte de glucosa dependiente de síntesis proteica y disparada por PGF $_{2\alpha}$ (Gómez de Alzaga y Jiménez de Asúa). La acción de la PGF $_{2\alpha}$ en presencia del TGF- β_1 , no es potenciada por la PGE $_1$. Dicha falta de efecto de la PGE $_1$, no es dependiente de la síntesis de la misma mediada por el TGF- β_1 . El TGF- β_1 no dispara incrementos en el contenido de DAG, ni causa la activación de la PKC. Sin embargo el TGF- β_1 complementa con los eventos dependientes de PKC y PTK, para inducir la entrada en la fase S. Insulina, PGE $_1$, o la combinación de ambas, sólo causan mitogénesis con el 1-oleil-2-acetil glicerol (OAG), un análogo del DAG y activador de PKC. No obstante, insulina más TGF- β_1 inducen la síntesis de ADN, aunque no así la combinación de TGF- β_1 más PGE $_1$, pero la proliferación causada por la primera combinación se ve aún más incrementada por la presencia de PGE $_1$. Estos hallazgos sugieren fuertemente que el TGF- β_1 y la insulina actúan vía mecanismos de señales separados (Gómez de Alzaga y Jiménez de Asúa).

También hemos demostrado que en células donde la PKC ha sido regulada negativamente por tratamiento de las mismas con 12-tetradecanoil-13-forbol acetato (TPA), el TGF- β_1 despliega varias acciones señalizantes. En estas células el TGF- β_1 induce la transcripción del ARN mensajero (ARNm) de la ciclina D $_1$ y la mitogénesis (Cadenas, Goin y Jiménez de Asúa). Bajo dicha condición la PGF $_{2\alpha}$ dispara TP y provoca una menor expresión del ARNm de la ciclina D $_1$, fallando la inducción de la entrada en la fase S. Dicho tratamiento no confiere la habilidad al TGF- β_1 de disparar aumentos tempranos de TP. En contraste, en células que poseen actividad PKC, el TGF- β_1 no dispara la transcripción del ARNm de la ciclina D $_1$ y tampoco induce la respuesta proliferativa. Estos resultados indican que la PKC debe jugar al menos dos roles separados. El primero podría concernir la posibilidad de que la actividad de la PKC se requiera para asegurar una expresión completa del ARNm de la ciclina D $_1$ y también de la respuesta

TGF β_1 displayed various signalling actions. In these cells TGF β_1 induce cyclin D $_1$ mRNA transcription and mitogenesis (Cadenas, Goin & Jiménez de Asúa). Under such conditions PGF $_{2\alpha}$ triggers TP and causes less cyclin D $_1$ mRNA expression failing to induce entry into S phase. Such treatment does not confer TGF β_1 ability to trigger early TP increases. In contrast, in cells possessing PKC activity, TGF β_1 does not trigger cyclin D $_1$ mRNA transcription nor induce proliferative response. These results indicate that PKC might be playing at least two separate roles. The first would concern the possibility that PKC activity is required to ensure full PGF $_{2\alpha}$ induced mRNA cyclin D $_1$ expression and mitogenic response. The second would deal with the possibility that specific PKC-mediated events might act by restraining TGF β_1 receptors (TGF β rs) signalling action. An alternative possibility is TPA might confer TGF β_1 signalling ability to TGF β rs via a mechanism independent of alteration in PKC activity. Whatever the process in question we are aiming to establish whether under such conditions either TGF β R I and II undergo mRNA transcription and content conferring them such unusual signalling capacity. Our goal is to understand how PGF $_{2\alpha}$ and PGE $_1$, insulin and TGF β_1 regulate commitment for DNA replication. We found that upon PGF $_{2\alpha}$ short stimulation cells only retain the ability to undergo DNA replication when either PGE $_1$, insulin or TGF β_1 are added at latter times of PGF $_{2\alpha}$ stimuli. Such ability conferred via insulin, PGE $_1$ or TGF β_1 appears to lie upon in their ability to prevent cyclin D $_1$ mRNA degradation via various signalling mechanisms which are under study (Sauane & Jiménez de Asúa).

Finally we are elucidating the mechanisms by which the Leukemia inhibitory factor (LIF) confer these cells proliferative ability (Schere-Levy & Jiménez de Asúa). Studying LIF signals is relevant to understand the mechanisms underlying pluripotential stem cells maintenance which remain as yet unknown.

mitogénica inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$. La segunda tendría que ver con la posibilidad de que eventos específicos mediados por PKC puedan actuar reprimiendo la acción señalizante de los receptores del $\text{TGF-}\beta_1$ ($\text{TGF-}\beta_1\text{rs}$). Una posibilidad alternativa es que el TPA le confiera a los $\text{TGF-}\beta_1\text{rs}$ una actividad señalizante vía un mecanismo independiente de la alteración de la actividad de la PKC. Cualquiera sea el proceso en cuestión estamos intentando establecer si bajo dichas condiciones si a los $\text{TGF-}\beta_1\text{rs}$ les es conferido una capacidad señalizante inusual. Nuestro meta es comprender cómo la $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_1 , insulina y $\text{TGF-}\beta_1$ regulan la determinación de las células para la replicación del ADN. Hemos encontrado que sobre una corta estimulación de las células con la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sólo conservan la habilidad de replicar el ADN cuando tanto la PGE_1 , insulina o $\text{TGF-}\beta_1$ son añadidos a tiempos tardíos de la estimulación con $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dicha habilidad conferida vía insulina, PGE_1 o $\text{TGF-}\beta_1$, parece apoyarse sobre sus habilidades para prevenir la degradación del ARNm de la ciclina D_1 vía varios mecanismos señalizantes que están bajo estudio (Sauane y Jiménez de Asúa).

Finalmente estamos dilucidando los mecanismos por el cual el factor inhibitorio de la leucemia (LIF), le confiere a estas células la capacidad proliferativa (Schere-Levy y Jiménez de Asúa). El estudio de las señales del LIF es pertinente para comprender los mecanismos que subyacen en el mantenimiento de células embrionarias pluripotenciales, el cual permanece hasta ahora desconocido.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- M. Goin, O. Pignataro and L. Jiménez de Asúa: Early cell cycle diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiate prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) induce mitogenesis in Swiss 3T3 cells. **FEBS Lett.** **316** (1993) 68-72.
- 2- M.B. Gómez de Alzaga, M. Goin, M. Ortiz and L. Jiménez de Asúa: Transforming growth factor β_1 ($\text{TGF}\beta_1$) insulin and prostaglandin E_1 (PGE_1) enhance prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) mitogenic action in Swiss 3T3 cells via separate events. **FEBS Lett.** **356** (1994) 21-24.

- 3-M. Ortiz, M. Goin, M.B. Gómez de Alzaga, S. Hammarstrom and L. Jiménez de Asúa: Mevalonic Acid synthesis requirement for epidermal growth factor (EGF) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) mitogenic response in Swiss 3T3 cells. **J. Cell Physiol.** **162** (1995) 139- 146.
- 4-L. Jimenez de Asua, M. Goin, M. Ortiz and M. Gomez de Alzaga: A mitogenic and hormonal signalling network regulate mammalian cell division commitment time. In: **Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Radiation Injury**. Eds. Nigam, S., Honn, K.V. and Marnett, L. **Plenum Press, New York, N.Y.**, pp. 449-454 (1995).
- 5-L. Jimenez de Asua and M. Goin: Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) triggers protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase activity in cultured mammalian cells. In: **Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Radiation Injury**. Eds. Nigam, S., Honn, K.V. and Marnett, L. **Plenum Press, New York, N.Y.**, pp. 534-541 (1995).

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS
NACIONALES E INTERNACIONALES /
COMMUNICATIONS PRESENTED IN
NATIONAL AND INTERNATIONAL
SCIENTIFIC MEETINGS**

- Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair Meeting, St John College, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom sponsored by Nestle and by the British Society for Cell Biology Travel Award, September 24 to October 1st, 1993.
- L. Jiménez de Asúa, M. Goin, M. Ortiz and M. Gómez de Alzaga: Multiple Signalling transduction mechanisms govern mammalian cell commitment for DNA replication.
- Eicosanoid and Other Bioactive Lipids and Cancer, Inflammation and Radiation Injury, Washington, October 11-16, 1993. Invited as Chairman of Lipid Mediated Signalling Mechanisms.
- L. Jiménez de Asúa and M. Goin: Prostaglandin F_{2α} triggers protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase activity in cultured mammalian cells.
- Eicosanoid and Other Bioactive Lipids and Cancer, Inflammation and Radiation Injury, Washington, October 11-16, 1993.
- L. Jiménez de Asúa, M. Goin, M. Ortiz and M. Gómez de Alzaga: A mitogenic and Hormonal Signalling Network regulate mammalian cell division commitment time.
- Stem Cells in Development and Cancer August 20-23, 1995, Glasgow 1995, Scotland, United Kingdom Supported by Nestle and AICR.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

Doctor de la Universidad de Buenos Aires. María Mercedes Goin. "Mecanismos de control de la división celular. Participación de quinasas de proteínas en la mitogénesis inducida por prostaglandina F_{2α} en células Swiss 3T3" / "Cell cycle control mechanisms. Prostaglandin F_{2α} induced kinases activity involved in Swiss 3T3 cells mitogenesis". Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1994. Director: L. Jiménez de Asúa.

**JURADOS DE TESIS DOCTORALES/
MEMBERSHIP OF PH.D. THESES
TRIBUNALS**

L. Jiménez de Asúa

Licenciada Mirta Brignoni. "Proteínas apicales en células epiteliales: rol de segundos mensajeros en la exocitosis" / *"Epithelial cells apical proteins: second messengers role in exocytosis"*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.

**COMITES EDITORIALES DE REVISTAS
CIENTIFICAS / EDITORIAL BOARD
MEMBER**

- Cell Biology International.
- Journal of Cellular Physiology (Since January 1st 1995).

SUBSIDIOS / GRANTS

L. Jiménez de Asúa

- Merck Sharp and Dohme Medical Research Grant, Rahway, New Jersey, U.S.A 1993-1994.
- Becton and Dickinson, New Jersey, USA, 1994.
- Cámara Argentina de Especialidades Medicinales, Argentina, 1995.
- Association For International Cancer Research (AICR), Scotland, United Kingdom October 1st 1993 - September 30th, 1994 and October 1st, 1994 - September 30th, 1996.
- Whirpool, Argentina.
- IBM, Argentina.

Lab 106

Laboratorio de Biosíntesis de Almidón en Tejidos de Plantas Superiores

*Laboratory of Biosynthesis of Starch in Higher
Plant Tissues*

Personal Permanente / Permanent Staff

Juana S. Tandecarz

Silvia Moreno

Tesistas / Ph.D. Students

Fernando J. Ardila (hasta Mayo / until May 1993)

Andrea Rothschild

Silvia N. Bocca

Flavia Wald (desde Octubre / since October 1995)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Alejandra Guerchicoff (hasta Marzo / until March 1993)

María J. García (desde Marzo / since March 1995)

Mara Roset (desde Marzo / since March 1995)

BIOSINTESIS DE ALMIDON EN TEJIDOS NO FOTOSINTETICOS DE PLANTAS SUPERIORES

Los proyectos de investigación pueden ser divididos en los siguientes temas:

a) Iniciación de la biosíntesis de almidón

A pesar de que el almidón es de importancia mundial como alimento y para la industria, mucho queda todavía por conocer sobre el control genético y bioquímico de su síntesis, aun en especies de importancia en la agricultura como papa y maíz. El almidón está compuesto por amilosa y amilopectina, que difieren en el grado de ramificación de los glucanos α -1,4. El alargamiento en síntesis de almidón involucra el agregado secuencial de residuos de glucosa a cadenas de glucano, pero el aceptor usado para unir las primeras glucosas permanece todavía pobremente caracterizado. La existencia de un sistema enzimático unido a membrana en tubérculo de papa, capaz de sintetizar cadenas glucosídicas α -1,4 covalentemente unidas a proteína ha sido demostrado y caracterizado en este laboratorio. Se ha propuesto un mecanismo en dos etapas: la primera etapa, catalizada por la UDP-glucosa: proteína transglucosilasa (UPTG), es la formación de una glucoproteína con la enzima misma como aceptora de glucosas y el UDP-glucosa como el dador de glucosas. La segunda etapa es la elongación de la UPTG glucosilada. Se ha descrito un mecanismo similar para la síntesis de glucógeno en sistemas animales donde la proteína glucosilada, llamada glicogenina, se encuentra covalentemente unida a glucógeno.

A pesar del interés de estas observaciones *in vitro*, queda por obtenerse una evidencia concluyente *in vivo*, a nivel de la planta entera, sobre el papel que desempeña la UPTG en la síntesis del almidón. La función de la enzima será evaluada *in vivo* manipulando genéticamente su expresión en plantas de papa transgénicas (represión y sobreexpresión) y mediante la caracterización de su

STARCH BIOSYNTHESIS IN NON PHOTOSYNTHESIZING TISSUES OF HIGHER PLANTS

The research projects can be divided into the following topics:

a) Initiation of starch biosynthesis

Though starch is of world-wide importance for food and industry, much is still to be known on the biochemical and genetic control of its synthesis, even in major crop species like potato and maize. Starch is composed of amylose and amylopectin, differing in the branching levels of the α -1,4-glucans. Elongation in starch synthesis involves the sequential addition of glucosyl residues to glucan chains but the acceptor used for attaching the first glucosyl units is still poorly identified. The occurrence of a membrane-bound enzymatic system in potato tuber capable of synthesizing α -1,4-glucosidic chains covalently linked to protein has been demonstrated and characterized by our group. A two-step mechanism has been proposed. The first step, catalysed by UDP-glucose: protein transglucosylase (UPTG), is the formation of a glucoprotein with the enzyme itself as the glucosyl acceptor and UDP-glucose as the glucosyl donor. The second step is the elongation of glucosylated UPTG. Similar mechanisms have been also described by others in animals.

The aim of the present proposal is to identify proteins and genes active in the initiation step of starch synthesis in potato (*Solanum tuberosum* L ssp. *tuberosum*). In that respect, the role of the UPTG will be assessed *in vivo* by genetically manipulating its expression in transgenic potato plants (repression and overexpression) and by characterizing the phenotypical, physiological and biochemical impacts.

In both the transformed and untransformed potato plants, the detailed analysis of the expression of the gene, of the starch synthesis pattern and of the phenotypical and physiological status of the plants will lead to a better understanding of the very early stages of potato starch

impacto fenotípico, fisiológico y bioquímico.

El análisis detallado de la expresión del/os gen(es), del patrón de síntesis de almidón y del status fenotípico y fisiológico de las plantas transformadas y no transformadas conducirá a una mejor comprensión del papel que desempeña la enzima en los primeros estadios de la síntesis de almidón en papa.

El objetivo de nuestras investigaciones es identificar proteínas y genes activos en la iniciación de síntesis de almidón en papa (*Solanum tuberosum* L ssp. *tuberosum*). Los resultados proveerán información esencial sobre los mecanismos de iniciación de la síntesis de almidón en papa. En base a las propiedades *in vitro* de las enzimas y de los complejos enzimáticos aislados de fracciones subcelulares de papa y maíz, se han postulado hipótesis sobre el mecanismo de iniciación, que serán puestas a prueba en la planta usando clonado molecular y transformación genética de plantas. La papa es susceptible de transformación genética estable (en contraste con los cereales) y es el modelo de elección para este estudio.

Esta investigación determinará si la iniciación vía UPTG es el paso limitante en la síntesis de almidón. Los gránulos de almidón en cloroplastos y en plástidos no fotosintéticos difieren en números, tamaño y forma, y reflejan mecanismos específicos de síntesis y/o depósito de α -glucanos. Esta investigación deberá indicar si parte de este control se ejerce a nivel de iniciación y determinará si el mismo mecanismo de iniciación está involucrado en la síntesis de ambos polisacáridos: amilosa y amilopectina.

Tomados en conjunto, los resultados que se espera obtener ayudarán a definir estrategias para mejorar el contenido de almidón en cultivares de papa, en términos de rendimiento y calidad, contribuyendo a una mejor armonización entre producción agronómica y demandas industriales.

synthesis.

The present investigation will provide essential information on the initiation mechanisms of potato starch synthesis. Based on the in vitro properties of enzymes and enzymatic complexes isolated from subcellular fractions of potato and maize, hypotheses have been put forward as to the priming mechanisms, which will now be tested in the plant using molecular cloning and plant genetic transformation. Potato is readily amenable to stable genetic transformation (contrasting with cereals) and is the model of choice for this investigation.

This research will determine whether initiation involving UPTG is rate-limiting in the synthesis of starch.

Starch granules in chloroplasts and in non-photosynthetic plastids are different in number, size and shape, reflecting specific mechanisms of α -glucan synthesis and/or deposition. This research should indicate whether part of this control is exerted at the level of initiation.

Taken together, the resulting information will help in defining strategies for improving the starch content of potato cultivars, both in terms of yield and of quality contributing to a better match between crop productions and industrial demands.

b) Starch synthesis in in vitro microtubers

It is well known that accumulation of tuber-specific proteins closely correlates with starch formation. Although tuber-specific genes are normally expressed in tubers, under certain conditions they can be induced to high levels of expression in other organs. Research in this laboratory principally concerns the characterization and isolation of enzymes in potato tuber that play a significant role in starch biosynthesis during development. For this purpose, we make use of an efficient in vitro tuberization system for the production of microtubers from nodal cuttings of micropropagated plants. We demonstrated that phosphorylase isoenzymes respond strongly to elevated

b) Síntesis de almidón en microtubérculos *in vitro*

Se sabe que la acumulación de proteínas específicas de tubérculo está estrechamente relacionada con la formación de almidón. Además los genes específicos de tubérculo bajo ciertas condiciones pueden ser inducidos a altos niveles de expresión en otros órganos. Las investigaciones llevadas a cabo en este laboratorio están principalmente relacionadas con el aislamiento y la caracterización de enzimas que desempeñan un papel importante en la biosíntesis de almidón durante el desarrollo de tubérculos de papa. Con este fin, utilizamos un sistema de tuberización *in vitro* para la producción de microtubérculos a partir de explantos nodales de plantas micropropagadas. Hemos demostrado que las isoenzimas de fosforilasa responden fuertemente a niveles elevados de sacarosa en este sistema. El control de la expresión de genes de las enzimas metabolizantes de almidón en plantas superiores por factores exógenos y endógenos está siendo actualmente investigado.

levels of sucrose in this system. Control of gene expression of starch metabolizing enzymes in higher plants by exogenous and endogenous factors is currently being investigated.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

A) Publicaciones originales / Original publications

- 1- S. Moreno y J.S. Tandecarz: Size-distribution and translational activity of polysomes isolated from tuber-derived callus of *Solanum tuberosum*. **Anales Asoc. Quím. Argent.** **81** (1993) 253-260.
- 2- A. Rothschild y J.S. Tandecarz: UDP-Glucose: protein transglucosylase in developing maize endosperm. **Plant Science** **97** (1994) 119-127.
- 3- S. Moreno y J.S. Tandecarz: Limited proteolysis by papain alters primer requirement of potato tuber phosphorylase. **Plant Physiol. Biochem.** **32** (1994) 641-648.
- 4- M. García-Patrone y J.S. Tandecarz: A glycoprotein multimer from *Bacillus thuringiensis* sporangia: Dissociation into subunits and sugar composition. **Mol. Cell. Biochem.** **145** (1995) 29-37.
- 5- J.S. Tandecarz, F.J. Ardila, S.N. Bocca, S. Moreno y A. Rothschild: On the initiation of starch synthesis. En: **Current Topics in Plant Physiology**. H.G. Pontis, G.L. Salerno and E. Echeverria eds., American Society of Plant Physiologists (publishers) **14** (1995) 107-114.

VISITAS CORTAS A LABORATORIOS /
SHORT VISITS TO LABORATORIES

- Beca del Instituto de Cooperación Iberoamericana (ICI) a Andrea Rothschild. Centro de Investigación y Desarrollo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, España. Enero-Abril 1995.
- "UNESCO short-term fellowship in Biotechnology" to Silvia N. Bocca. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Département de Biochimie et Biologie appliquées, Unité d'Enseignement et de Recherche de Biologie Végétale, Gembloux, Bélgica, Agosto-Noviembre de 1995.

PRESENTACIONES POR INVITACION EN
CONGRESOS CIENTIFICOS / INVITED
PRESENTATION IN SCIENTIFIC MEETINGS

- First International Symposium on Sucrose Metabolism. Mar del Plata, Mayo de 1995.
J.S. Tandecarz: On the initiation of starch synthesis.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS
NACIONALES E INTERNACIONALES /
COMMUNICATIONS PRESENTED IN
NATIONAL AND INTERNATIONAL
SCIENTIFIC MEETINGS

- Third International Symposium on the Molecular Biology of the Potato, Santa Cruz, California (U.S.A.), July 25-30, 1993.
 - S. Moreno, S. Fanchiotti and J.S. Tandecarz: Phosphorylase enzymes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose in an *in vitro* tuberization system.
 - A. Rothschild, S. Bocca and J.S. Tandecarz: Inhibition of potato tuber UDP-glucose: protein transglucosylase by a maize solubilized preparation.
- XX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. San Carlos de Bariloche, Río Negro, 10-12 noviembre de 1993.
 - S. Moreno y J.S. Tandecarz: Altos niveles de fosforilasa en cultivos de tejidos de papa en respuesta a sacarosa.
- XXIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Villa Carlos Paz, Córdoba, 17-21 noviembre de 1993.
 - A. Rothschild, S. Bocca y J.S. Tandecarz: Purificación y caracterización parcial del inhibidor de la UDP-Glc: proteína transglucosilasa de endosperma de semillas inmaduras de *Zea mays*.
 - S. Moreno y J.S. Tandecarz: Altos niveles de fosforilasa en cultivos de tejidos de papa en respuesta a sacarosa.
 - A. Guerchicoff, S. Moreno, A. Rothschild y J.S. Tandecarz: Comparación de perfiles de fosforilasa de *Zea mays*.
- 4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, Holanda, 19 al 24 de junio de 1994.
 - J.S. Tandecarz: Isolation of a factor in developing maize endosperm that inhibits UDP-Glc: protein transglucosylase activity.
- XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Puerto Iguazú, Misiones, 26-29 de octubre de 1994.
 - M. García Patrone y J.S. Tandecarz: Glicoproteínas de esporangios de *Bacillus thuringiensis*.
 - S. Moreno, C. Romano y J.S. Tandecarz: Acción del ácido jasmónico en la tuberización *in vitro* de papa.
- First International Symposium on Sucrose Metabolism, Mar del Plata, 7 al 13 de mayo de 1995.

- S.N. Bocca, A. Rothschild y J.S. Tandecarz.: Purification of potato tuber and maize endosperm UDP-Glc: protein transglucosylase using affinity chromatography.
- S. Moreno y J.S. Tandecarz: Interaction of plant growth regulators, sucrose and jasmonic acid in the *in vitro* tuberization of potato.

- XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Villa Giardino, Córdoba, 15-18 de noviembre de 1995.
 - S.N. Bocca, A. Rothschild y J.S. Tandecarz: Purificación de anticuerpos policlonales específicos para UDP-glucosa: proteína transglucosilasa de papa por cromatografía de afinidad.
 - S.N. Bocca, M. Roset y J.S. Tandecarz: Transferencia de xilosa a un aceptor endógeno de papa: identificación de la enzima y de su aceptor como UDP-glucosa: proteína transglucosilasa.
 - S. Moreno, M.J. García, S.N. Bocca y J.S. Tandecarz: Efecto de hormonas vegetales sobre la tuberización *in vitro* de papa y su relación con la iniciación de la síntesis de almidón.

**CONFERENCIAS DICTADAS EN
INSTITUCIONES DEL EXTERIOR /
LECTURES DELIVERED AT FOREIGN
INSTITUTIONS**

- 1- "Isolation and partial characterization of an endogenous UDP-glucose: protein transglucosylase inhibitor from developing endosperm of *Zea mays*". Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan (U.S.A.). Agosto 3, 1993.
- 2- "Multiplicity of starch-metabolizing enzymes: a post-translationally modified phosphorylase". Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Miami, School of Medicine, Miami, Florida (U.S.A.), Agosto 9, 1993.
- 3- "Biología molecular de la síntesis y transformación del almidón". Departamento de Nutrición Experimental, Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo, Brasil. Noviembre 23, 1994.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- 1- Doctor en Ciencias Químicas Fernando J. Ardila. "Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis de almidón". / "*Some aspects on the initiation of starch biosynthesis*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.

**TESINAS DE LICENCIATURA /
DEGREE MINI-THESES**

- 1- Licenciada en Ciencias Biológicas Alejandra Guerchicoff. "Formas moleculares de fosforilasa en semillas inmaduras de *Zea mays*". / "*Molecular forms of phosphorylase in Zea mays seeds*", Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.

**JURADO DE TESIS DOCTORAL /
MEMBERSHIP OF PH.D. THESIS
TRIBUNALS**

- Doctor de la Universidad de Buenos Aires Jorge Pedro Fernández Murray "Aislamiento y caracterización de una aminopeptidasa en el ascomicete *Saccobolus platensis*. Efecto de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática" / "*Isolation and characterization of an aminopeptidase from the ascomycete Saccobolus platensis. Effect of substrate phosphorylation on enzyme activity*". Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.
- Doctora en Ciencias Biológicas Adriana Andreu "Aspectos moleculares en la interacción papa-*Phytophthora infestans*" / "*Molecular aspects of the potato-Phytophthora infestans interaction*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 1995.
- Doctor de la Universidad de Buenos Aires (orientación en Ciencias Químicas), Silvana Merello, "Glicosilaciones no convencionales en protozoarios" / "*Non-conventional glycosylations in protozoa*". Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Título del proyecto: "Iniciación de la biosíntesis de α -glucanos unidos covalentemente a proteína en plantas de *Zea mays* normales y en mutantes en la síntesis de almidón" / "*Biosynthesis initiation of α -glucans covalently linked to protein in Zea mays normal plants and in endosperm mutants in starch synthesis*". Universidad de Buenos Aires - EX 023 Programación 1991-1993. Directora: Dra. Juana S. Tandecarz.
- Título del proyecto: "Inducción *in vitro* de microtubérculos de variedades de *Solanum tuberosum* de importancia comercial en la República Argentina. Su relación con la biosíntesis de almidón" / "*In vitro microtuber induction of Solanum tuberosum varieties commercially important in Argentina. Its relation to starch biosynthesis*". Universidad de Buenos Aires - EX 164 Programación 1991-1993. Directores: Dra. Juana S. Tandecarz y Dra. Silvia Moreno.
- Título del proyecto: "Bioquímica y biotecnología vegetal". PID-BID (CONICET) N° 555. Programación 1992-1994. Directora: Dra. Juana S. Tandecarz.
- Fundación Antorchas. Subsidio para viaje a Juana S. Tandecarz, para asistir al Third International Symposium on the Molecular Biology of the Potato, Santa Cruz, California, USA, julio 25-30, 1993.
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Subsidio para viaje a Juana S. Tandecarz, para asistir al Third International Symposium on the Molecular Biology of the Potato, Santa Cruz, California, USA, julio 25-30, 1993.
- Título del proyecto: "Control del proceso de tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* y su relación con la síntesis de almidón" / "*Control of the in vitro tuberization process in Solanum tuberosum and its relation to starch synthesis*". Universidad de Buenos Aires - EX 305 Programación 1994-1997.

Directores: Dra. Juana S. Tandecarz y Dra. Silvia Moreno.

Título del proyecto: "Caracterización bioquímica de la iniciación de la síntesis de almidón en *Solanum tuberosum* y en *Zea mays*" / "*Biochemical characterization of starch synthesis initiation in Solanum tuberosum and Zea mays*".

Universidad de Buenos Aires - EX 169 Programación 1994-1997.

Directora: Dra. Juana S. Tandecarz

Lab 107

Laboratorio de Biología Celular y Molecular

Laboratory of Cellular and Molecular Biology

Personal Permanente / *Permanent Staff*

Tomás A. Santa Coloma

Personal Técnico Profesional / *Technical Staff*

Eduardo Cafferata (desde Abril / *since April 1981*)

César R. Gonzalez Solveyra (desde Enero / *since January 1995*)

Becarios Post-Doctorales / *Post-Doctoral Fellows*

Martín Radrizzani (desde Enero / *since January 1995*)

Estudiantes de Pre-grado / *Undergraduate Students*

Carolina Carrillo (1994-1995)

Anatilde Gonzalez Guerrico (desde Mayo / *since May 1995*)

Leopoldo Tomás Petreanu (desde Diciembre / *since December 1995*)

Mariela Szwarcberg (1993-1995)

Pasantías / *Visitors*

Gabriela Brenta (Julio de 1995 a Diciembre de 1995 / *July 1995 up to December 1995*)

Mariana Córdoba (desde Enero / *since January 1994*)

Jorge Genovese (1994-1995)

MODULACION DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR POR TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 (TGF- β 1)

Un número creciente de factores responsable de la regulación del crecimiento y diferenciación celular han sido caracterizados recientemente. Entre ellos, los iones calcio y los factores de crecimiento de la familia del "transforming growth factor-beta" (TGF- β s) son particularmente interesantes. El papel del calcio como segundo mensajero para la regulación del crecimiento y diferenciación celular está siendo reconocido en numerosas publicaciones y los TGF- β s tiene numerosos efectos que dependen de las células donde actúa y de ambiente extracelular.

TGF- β es un homodímero multifuncional que posee características estructurales únicas. Varias proteínas que unen TGF- β han sido caracterizadas y algunas de ellas clonadas. Tres receptores diferentes, llamados Tipo I, Tipo II y Tipo III, han sido particularmente bien caracterizados. Los receptores de Tipo I y II son kinasas de serina/treonina. La existencia de varias moléculas con probablemente vías de acción diferentes sugieren que el TGF- β podría tener una interacción muy compleja con las células. En este sentido, el mecanismo de transducción de señal de TGF- β 1 es aún desconocido. Existe alguna evidencia de algún papel de las proteínas Gi. Evidencias recientes sugieren que la fosfolipasa C, a través de una vía que involucra fosfatidil-colina, podría estar también involucrada en la regulación del crecimiento celular por TGF- β .

En estudios previos hemos observado que TGF- β 1 modula la homeostasis del calcio intracelular en células de Sertoli (Endocrinology, 132, 1745-1749), en cardiomiocitos de rata y en corazones de rata perfundidos. Entonces, los efectos de TGF- β 1 sobre el crecimiento celular, diferenciación celular y protección contra stress, podrían iniciarse por cambios en la homeostasis del calcio intracelular. Bajo esta hipótesis,

MODULATION OF INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 (TGF- β 1)

An increasing number of factors responsible for regulation of cell growth and differentiation have been characterized in the past several years. Among them, calcium ions and the peptide growth factors belonging to the transforming growth factor family (TGF- β s) are particularly interesting. The role of calcium as a second messenger for regulation of cell growth and differentiation is being increasingly appreciated and TGF- β s have a plethora of different cellular effects, which depend on the target cells and their extracellular environment.

TGF- β is a multifunctional homodimeric molecule possessing unique structural characteristics. Several membrane proteins that bind TGF- β have been characterized and some recently cloned. Three different receptors, the so called Type I, Type II and Type III, have been particularly well characterized. The existence of several molecules with putative signaling pathways suggests that TGF- β might have a very complex interaction with target cells. In this regard, the mechanism of signal transduction by TGF- β s is still largely unknown. Some evidence for a role of Gi proteins exists. Recent evidence also suggests that phospholipase C, through a phosphatidyl choline pathway, might also be involved in regulation of cell growth by TGF- β . The Type I and Type II receptors are Serine/Threonine kinases.

In preliminary studies we have observed that TGF- β modulates calcium homeostasis in rat Sertoli cells, in heart myocytes from neonate rats, and in perfused rat hearts. Therefore, TGF- β 1 effects on cell growth, differentiation and protection against stress might be initiated by changes on intracellular calcium homeostasis. Under this hypothesis, TGF- β 1 would produce growth arrest, differentiation or cytoprotection by inhibiting calcium uptake, which in turn would turn-off the expression of various early, growth-related and calcium-

TGF- β 1 produciría parte de sus efectos celulares inhibiendo la captación de calcio y aumentando su expulsión, de modo de compensar cualquier sobrecarga de calcio. La menor disponibilidad de calcio inhibiría asimismo varios genes dependientes de calcio y relacionados con la división y diferenciación celular (por ejemplo c-myc). Esta hipótesis no descarta la existencia de otras vías de transducción de señal para TGF- β 1 independientes de calcio. Nuestro objetivo es obtener mayor evidencia para sostener esta hipótesis y obtener información adicional sobre los mecanismos de transducción de señal de TGF- β 1. Estamos usando asimismo display diferencial para identificar genes relacionados con la respuesta a TGF- β 1 en diferentes sistemas.

dependent genes, such as c-myc. This hypothesis, however, do not preclude the existence of other pathways that might be modulated by TGF- β 1 in a calcium-independent manner. Our objective is to obtain further evidence to support this hypothesis and to obtain additional information about the mechanisms of signal transduction and cytoprotection by TGF- β . We are also using differential display to identify genes that respond to TGF- β 1 in several model systems.

PUBLICACIONES/ PUBLICATIONS

- 1- P. Grasso, L.E. Reichert, M.B. Sporn and T.A. Santa Coloma: Transforming Growth Factor- β 1 modulates calcium metabolism in Sertoli cells. **Endocrinology** **132** (1993) 1745-1749.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES E INTERNACIONALES/ COMMUNICATIONS PRESENTED IN NATIONAL AND INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS

- International Symposium on Preparative Chromatography, Washington D.C., USA, 1994.
- T.A. Santa Coloma, J.A. Mazza and E.H. Charreau: Molecular sieving improves affinity chromatography using triazine dyes.
- XXX reunión científica de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas. Iguazú, Misiones, Argentina, 1994.
- C. Carrillo, M. Szwarcberg, E. Cafferata, J.A. Genovese y T.A. Santa Coloma: Regulación del ARNm del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por TGF- β en cardiomiocitos de rata.
- 77th Annual Meeting of The Endocrine Society, June 14-17, Washington, D.C. USA, 1995.
- T.A. Santa Coloma, C. Carrillo, M. Szwarcberg, E. Cafferata, J.A. Genovese, M. O'Reilly, A.B. Roberts and M.B. Sporn: TGF- β regulates mRNA levels of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in neonatal rat cardiac myocytes.
- XXXI reunión de SAIB, Villa Giardino, Córdoba, Argentina, 1995.
- M. Córdoba, T.A. Santa Coloma, N. Beorlegui y M. Beconi: Variación de la concentración de calcio intracelular en la capacitación de semen bovino congelado.
- E.G. Cafferata, A. Gonzalez Guerrico, O.H. Pivetta y T.A. Santa Coloma: Identificación mediante "differential display" de genes específicamente regulados por diferentes factores que afectan la expresión del CFTR (canal

de cloro afectado en Fibrosis Quística).

- M. Szwarcberg, C. Carrillo y T.A. Santa Coloma: Regulación por TGF- β de los niveles de calcio citoplasmático en cardiomiocitos.

TESISINAS DE LICENCIATURA /
DEGREE MINI-THESES

Lic en Ciencias Biológicas Mariela Szwarcberg. Regulación de los niveles de calcio citosólico por el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) en cardiomiocitos de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE
PROMOCION DE LA CIENCIA /
ACTIVITIES IN SCIENCE PROMOTIONS
INSTITUTIONS

El Dr. Tomás A. Santa Coloma es desde 1994 Miembro de la Comisión Asesora de la Fundación Foro Argentino de Biotecnología (FAB) y editor responsable de la gacetilla de dicha Institución. / *Dr. Tomás A. Santa Coloma is, since 1994, a member of the Board of Consultants for the foundation "Argentinean Forum for Biotechnology" (FAB) and editor for the FAB bulletin.*

SUBSIDIOS / GRANTS

- The Rockefeller Foundation (USA), 1993-1994.
- National Institutes of Health, NCI contract (USA), 1993.
- Fundación Antorchas (Argentina), 1994, 1995.
- Dos subsidios de Fundación Alberto J. Roemmers (Argentina), 1995.
- Asociación FIPAN (Argentina), 1995.

Lab 108

Laboratorio de Biosíntesis y Estructura de Polisacáridos de Reserva

*Laboratory of Biosynthesis and Structure of
Storage Polysaccharides*



Personal Permanente / Permanent Staff

Clara R. Krisman de Fischman

Investigadores Post-Doctorales / Post-Doctoral Fellows

Diana S. Tolmasky

Viviana Lepek (desde Abril de 1992 hasta Diciembre de 1995 /
since April 1992 to December 1995)

Tesistas / Ph.D. Students

José Alfredo Curá (desde Agosto de 1987 hasta Diciembre
de 1995 / *since August 1987 to December 1995*)

Eduardo A. Pagano (desde Julio de 1993 hasta Enero de 1994 /
since July 1993 to January 1994)

Lorena Lerner (desde Marzo de 1995 / *since March 1995*)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Lorena Lerner (hasta Marzo / *until March 1995*)

Adrián Turjanski (desde Marzo de 1994 hasta Marzo de 1996 /
since March 1994 up to March 1996)

Cecilia Czibener (desde Septiembre de 1994 hasta Diciembre de
1995 / *since September 1994 to December 1995*)

Sebastián Kadener (desde Agosto / *since August 1995*)

Glucopolisacáridos de reserva del tipo α -1,4 - α -1,6 contenidos en plantas y tejidos animales

Nuestras principales líneas de investigación están dirigidas al estudio de los glucopolisacáridos α -1,4 - α -1,6 (glucógeno y almidón) desde el punto de vista estructural y bioquímico.

Células animales

Proceso de Iniciación involucrado en la biosíntesis del glucógeno:

En nuestro laboratorio, utilizando una fracción de hígado de rata, se ha demostrado que el punto de partida en la síntesis "de novo" del glucógeno es una proteína. Dicho polisacárido se construye a partir de la unión covalente de la primera glucosa a un aminoácido de la proteína. A esta proteína aceptora de las primeras glucosas, la llamamos GENESINA por génesis: origen.

Hemos demostrado que la unión aminoacil-glucosa es alcali estable y ácido labil, propiedad que se corresponde con la unión tirosina-glucosa.

Nuestro grupo ha postulado y demostrado que en el proceso de la biosíntesis del glucógeno, el nucleótido azúcar UDP-glucosa es requerido en dos etapas. Una, es en la formación del PRECURSOR, es decir del "primer" o "aceptor" unido covalentemente a la proteína. Esta reacción está catalizada por una actividad nueva que llamamos INICIADORA DEL GLUCOGENO (GI). La segunda, es como sustrato dador de los glucosilos en la elongación de los glucanos α -1,4. catalizado por la enzima GLUCOGENO SINTETASA para la formación del PRODUCTO. La introducción de las uniones α -1,6 es catalizada por la ENZIMA RAMIFICANTE. El glucógeno unido a proteína es sustrato de las enzimas amilolíticas. Los oligosacáridos liberados sirven de "primers" en la síntesis del glucógeno soluble, no-unido a proteína, según el mecanismo clásico.

Glucopolysaccharides α 1,4- α 1,6 stored in plant and animal cells

Our main lines of research are directed to the study of glucopolysaccharides α 1,4- α 1,6 (glycogen and starch) from a structural as well as from a biochemical point of view.

Animal cells

Initiation Process involved in Glycogen Biosynthesis:

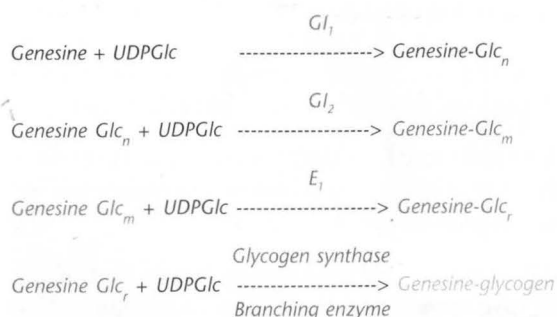
In our laboratory, using a rat liver fraction, it was demonstrated that the starting point in the "de novo" synthesis of glycogen is a protein. Said polysaccharide is built as from the covalent binding of the first glucose to an aminoacid of the protein. We called this acceptor protein of the first glucoses GENESINE due to genesis: origin.

We have demonstrated that the aminoacil-glucose bond is alkali stable and acid labile, a property which corresponds to the tyrosine-glucose bond.

Our group has postulated and demonstrated that in the process of glycogen biosynthesis the sugar nucleotide UDPGlucose is required in two steps. The first one, is in the formation of the "Primer" or "Acceptor" covalently bound to the protein. This reaction is catalyzed by a new enzymatic activity called GLYCOGEN INITIATOR (GI). The second one, as a substrate donor of the glucose in the elongation of α 1,4 glucans. This step is catalyzed by the enzyme GLYCOGEN SYNTHASE in the PRODUCT formation. The introduction of the α 1,6 bonds is catalyzed by the BRANCHING ENZYME. Glycogen bound to protein is a substrate of the amylolytic enzymes. The oligosaccharides liberated would be used as primers for the synthesis of soluble, non-protein bound glycogen, according to the classic mechanism.

Complementing these observations we have reported the presence of protein-bound glycogen not only in rat liver but also in Escherichia coli, rat heart and brain. Selecting

Reformulation of the model originally proposed for glycogen biosynthesis



Complementando estos estudios, hemos demostrado la presencia de glucógeno unido a proteína no sólo en hígado de rata sino también en *Escherichia coli*, corazón y cerebro de rata. Seleccionando condiciones apropiadas de incubación, podemos diferenciar el proceso de iniciación del de elongación

Finalmente en base a nuestros resultados hemos introducido una modificación al modelo originalmente propuesto. El modelo modificado se describe en la figura, el cual implica que:

- 1- El "primer" para la biogénesis del glucógeno es una proteína que denominamos GENESINA.
- 2- Hemos demostrado que la actividad enzimática nueva, INICIADORA del GLUCOGENO, en realidad corresponde a dos actividades secuenciales y diferentes que están involucradas en la etapa de iniciación: Gl_1 y Gl_2 asociadas a la actividad autoglucosilante genesina.
- 3- También postulamos la primera actividad elongadora E_1 . Esta actividad enzimática es diferente de la enzima Glucógeno Sintetasa.
- 4- El Mn^{++} es un activador de Gl_1 e inhibe el crecimiento posterior.
- 5- Partiendo de GENESINA (la proteína aceptora desnuda) vía el intermediario genesina glucosilada (glucogenina) se obtiene glucógeno macromolecular.

Los estudios estructurales y bioquímicos del polisacárido presente en el timo de rata indican que el mismo es similar a las partículas tipo β del glucógeno presente en el músculo cuyo diámetro promedio es de 20-30 nm. Estas partículas están localizadas en el citoplasma de las células T de la región cortical del timo.

En células Ehrlich-Lettré HD 33 de tumor ascítico se encuentra glucógeno en el espacio intranuclear. Este glucógeno es sintetizado y mantenido en el núcleo cuando se mantienen las células creciendo *in vivo*.

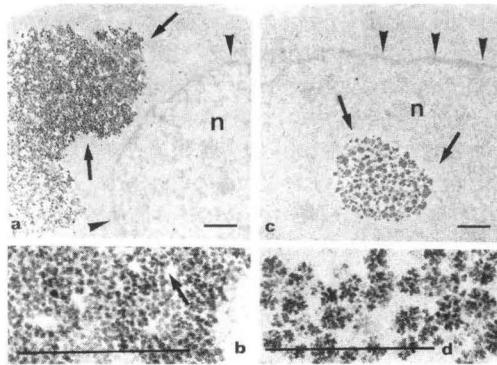
appropriate incubation conditions, we can differentiate the initiation process from the elongation one.

Finally, taking into account our results we have introduced a modification into the model originally proposed. The reformulated model is depicted in the figure and implies that:

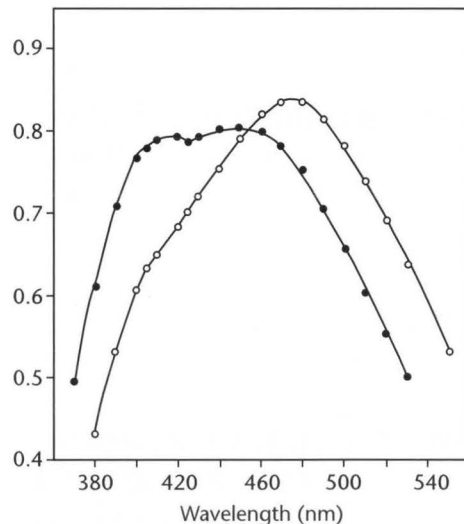
- 1-The primer for glycogen biosynthesis is a protein we called GENESINE.
- 2-We have demonstrated that the new enzymatic activity GLYCOGEN INITIATOR corresponds to two sequential and different activities which are involved in the initiation process: Gl_1 and Gl_2 associated to the autoglycosilating genesine.
- 3-We also postulated the first elongating activity E_1 . This enzymatic activity is different from the enzyme Glycogen Synthase.
- 4-The Mn^{++} is a Gl_1 activator and inhibits further growth.
- 5-From GENESINE (the naked acceptor protein) through the intermediary glycosylated genesine (glycogenin) macromolecular glycogen is obtained.

Chemical and biochemical analyses of the polysaccharides present in rat thymus indicate that it consists of glucose $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ linked. Electron microscopy reveals the presence of a polysaccharide similar to β glycogen particles present in liver and muscle with an average diameter of 20-30 nm. They are located in the cytoplasmic area of the T-cells from the cortical region of the thymus.

Intranuclear glycogen occurs in the mutant cells of Ehrlich-Lettré HD33 ascites tumor. They synthesize glycogen and store it mainly intranuclearly when growing *in vivo*, and exclusively in cytoplasm when permanently cultured as a suspension cell strain. Intranuclear and cytoplasmic glycogen were characterized in order to investigate the differences between them. This work was carried out with the collaboration of Dr. Marijana Kopun and Christoff



PTA stained glycogen deposits, in situ, of HD33 ascites cells grown *in vitro* (a, b) and of HD33 ascites tumor cells grown *in vivo* (c, d). Other cellular structures remain unstained. n = nucleus; arrowheads = nuclear envelope. Bar, 1 μ m. a: Large, cytoplasmic deposit (arrows) of densely packed glycogen particles. x8,000. b: Irregular subparticle arrangement of cytoplasmic glycogen particles. Structures resembling α -particles (arrow) are rare. x40,000. c: Intranuclear accumulation (arrows) of α -particles varying in size. x8,000. d: Rosette-shaped subparticle arrangement of intranuclear glycogen particles. x40,000



Absorption spectra after reaction with Krisman's reagent of nuclear (● --- ●) glycogen isolated from *in vivo* growing HD33 ascites tumor cells and cytoplasmic (○ --- ○) glycogen extracted from cultured HD33 ascites cells.

Cuando se prepara un cultivo de estas células, la presencia del glucógeno se detecta en el citoplasma. Los dos tipos de glucógeno, nuclear y citoplásmico, fueron analizados y estudiadas sus características. Este trabajo se hizo en colaboración con la Dra. Marijana Kopun y el Dr. Christoff Granzow del Instituto del Cáncer, DKFZ-Heidelberg.

Plantas - Polisacáridos:

Utilizando la metodología desarrollada en nuestro laboratorio estudiamos los polisacáridos de reserva contenidos en plantas de interés agronómico.

Los polisacáridos del tipo del glucógeno y del almidón presentes en el endosperma de semillas de cereales, fueron extraídos y fraccionados según su grado de ramificación y se caracterizaron detalladamente.

Utilizamos como modelo de cereal el maíz. Las variedades de maíz utilizadas fueron: sugary, waxy, amylose extender y otros de interés comercial. Los resultados obtenidos a partir de las diferentes semillas fueron los siguientes:

- Aparte del fitoglucógeno, que está presente sólo en el sugary o maíz dulce, la composición de los polisacáridos componentes del almidón (amilosa y amilopectina) es distinta y típica para cada genotipo.

- La amilosa se presenta no sólo como un polisacárido lineal sino además con un pequeño porcentaje de ramificaciones (2%).

- La amilopectina presenta un grado de ramificación que no es un valor constante. Este es típico para cada variedad.

A partir de estudios cuali y cuantitativos de los polisacáridos presentes en los diferentes granos, logramos redefinir los glucógenos, amilopectinas y amilasas según sus porcentajes de ramificación.

Granzow from the Cancer Institute, DKFZ, Heidelberg.

Plants - polysaccharides:

Taking advantage of the methodology developed in our laboratory, we started first with the study of the starch components, amylose and amylopectin, in plants of agronomic interest.

The starch and glycogen type polysaccharides present in the endosperm of mature cereal seeds were fractionated according to their branching degree.

We used maize as cereal model. The maize varieties analyzed were: sugary, waxy, amylose extender and other types of corn of commercial interest. It was found that:

- Besides phytyloglycogen, which is only present in sweet corn or sugary, the starch polysaccharide composition is different and apparently typical for each genotype.

- Amylose is present not only as a strictly linear polysaccharide but also with a small branching degree.

- Amylopectins present a branching degree which is not a constant value. This value is typical for each variety.

The qualitative and quantitative studies of the polysaccharides present in different seeds allowed a redefinition of glycogens, amylopectins and amyloses, according to their branching degree.

Application:

The methodology developed in our laboratory allowed the visualization of the introduction of some trait if it results in a structural change of the starch components. A linear correspondence between branching points and the wavelength at the maximum absorption (λ max) in the presence of Krisman's iodine reagent was obtained. Also a linear correspondence was obtained between amylose percentage and the percentage of floury or horny endosperm type. It is therefore suggested that it is possible

Aplicación:

La metodología desarrollada en nuestro laboratorio nos permite visualizar si la introducción de algún carácter da como resultado un cambio estructural sobre los polisacáridos del almidón. Pudimos determinar para los polisacáridos del tipo de glucanos α -1,4- α -1,6 una correlación lineal entre el porcentaje de ramificación y la longitud de onda de máxima absorción en presencia del reactivo de Krisman. También existe una correlación lineal entre el porcentaje de amilosa obtenido y el porcentaje de endosperma del tipo duro o harinoso. Por lo tanto, se sugiere que es posible predecir el tipo de endosperma relacionado con la dureza, conociendo la cantidad de amilosa presente en dicho almidón.

El conocimiento adquirido en nuestro laboratorio sobre los componentes del almidón del maíz y otros cereales, así como también nuestro actual proyecto de investigación, nos permiten definir la calidad del almidón y del glucógeno como una función de su estructura química y origen.

La relevancia de estos estudios reside en que permite la selección del almidón apropiado para ser usado ya sea en la industria de la alimentación o en otras aplicaciones.

Enzimas:

Este proyecto también incluye los estudios de las enzimas implicadas en la biosíntesis del glucógeno y del almidón es decir: iniciación, elongación y ramificación. Para el caso de las plantas nos interesa también conocer la utilización *in vivo* de los polisacáridos, especialmente durante la germinación en condiciones normales y de stress, así como también las enzimas involucradas en esta etapa.

to predict the endosperm type related to hardness, knowing the amount of amylose present in that starch. The knowledge acquired in our laboratory through the studies on the starch components from corn and other cereals as well as our present research project, let us define a quality of starch and glycogen as a function of its chemical structure and of its origin. The relevance of these studies consists in that they allow the selection of the appropriate starch to be used in food industries and in other applications.

Enzymes:

This project also includes the studies of the enzymes involved in the polysaccharides biosynthesis: initiation, elongation and branching. In plants we are also interested in knowing the in vivo use of polysaccharides, specially during germination in normal and stress conditions, as well as the enzymes involved in that step.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- J.A. Curá, D.S. Tolmasky, A. Reid, J.C. Salerno and C.R. Krisman: α 1,4- α 1,6 glucopolysaccharides contained in developing maize kernels. **Starch** **45** (1993) 206-209.
- 2- E.A. Pagano and C.R. Krisman: Endosperm α 1,4- α 1,6 glucopolysaccharides. Utilization during germination of sweet corn and other maize genotypes. **Starch** **45** (1993) 203-205.
- 3- D.S. Tolmasky, E.M. Salmoral, M.L. Blumenfeld and C.R. Krisman: Further studies on the primer formation for glycogen biosynthesis in rat heart. **Cell. Mol. Biol.** **39** (1993) 301-308.
- 4- E.M. Salmoral, J.A. Curá, E.A. Pagano, D.S. Tolmasky, V.C. Lepek, E. Favret and C.R. Krisman: Comparative studies of the α 1,4- α 1,6 glucopolysaccharides from crops of commercial interest. **Anales Asoc. Quím. Argentina** **81** (1993) 179-187. Número dedicado a honrar la memoria del Dr. Roberto O. Couso.
- 5- J.A. Curá, D.S. Tolmasky, V.C. Lepek, L. Lerner y C.R. Krisman: Further studies on the "de novo" process of α 1,4- α 1,6 glucopolysaccharides. Corn starch biogenesis. **Cell. Mol. Biol.** **40** (1994) 1007-1020.
- 6- C.R. Krisman: Dr. Luis F. Leloir, the Pioneer of Argentine Biological Sciences. Glycohistory. **Trends Glycosc. Glycotechnol.** **6** (1994) 417-425.
- 7- J.A. Curá and C.R. Krisman: Maize mutants. Part 1: Studies on their Starch Components. **Starch** **47** (1995) 210-213.
- 8- J.A. Curá, Per-Erik Jansson and C.R. Krisman: Amylose is not strictly linear. **Starch** **47** (1995) 207-209.

ACTUACION EN JURADOS DE TESIS DOCTORAL / EXAMINER FOR DOCTORAL THESIS

C.R. Krisman:

Fernando Jorge Ardila. "Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis del almidón" / *"Some aspects of the initiation of starch biosynthesis"*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.

Vivian A. Alvarez. "Enzimas lisosomales. Biosíntesis y translocación hacia los lisosomas en invertebrados" / *"Lysosomal enzymes. Biosynthesis and translocation to the invertebrates lysosomes"*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.

ACTUACION EN JURADOS DE TESINAS DE LICENCIATURAS / EXAMINER FOR DEGREE MINI-THESIS

C.R. Krisman:

Alejandra Guerchicoff Lemcke. Seminario de Licenciatura, "Formas moleculares de fosforilasa de *Zea Mays*" / *"Different molecular forms of Zea mays phosphorylase"*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1993.

Sandra G. Fanchiotti. Seminario de Licenciatura. "Localización y respuesta a sacarosa de una forma molecular de

fosforilasa de papa en plantas cultivadas *in vitro*" / *"Potatoe phosphorylase from in vitro cultures. Localization and modulation to sucrose content"*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

José Alfredo Curá. "Contenido de los glucopolisacáridos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ y las enzimas correspondientes contenidas en distintas variedades de maíz" / *"Glucopolysaccharides $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ and the enzymes contained in different varieties of Argentine corn"*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 1995. Director: C.R. Krisman.

TESIS DE MAESTRIA / MASTER DEGREES THESES

Eduardo A. Pagano. "Glucopolisacáridos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ del endosperma de maíz. Utilización durante la germinación, formación de tallo y raíces. Efecto de bajas temperaturas" / *"Corn Endosperm $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ Glucopolysaccharides: utilization during germination, shoot and root growth and low temperature effect"*. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 1993. Director: C.R. Krisman.

TESINAS DE LICENCIATURAS / DEGREE MINI-THESES

Lorena R. Lerner. Seminario de Licenciatura. "Mecanismo de acción de las enzimas ramificantes involucradas en la síntesis de glucógeno y almidón" / *"Mechanism of action of the branching enzymes involved in the synthesis of glycogen and starch"*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 1995. Director: C.R. Krisman.

CURSOS DE GRADO Y POST-GRADO / DEGREE AND POST-GRADUATE COURSES

Dictado de un ciclo de clases teóricas, problemas y seminarios en el curso de Química Biológica para Biólogos / *Biological Chemistry for Biologists*, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en la UBA. Mayo de 1993, 1994 y 1995. Tema: "Hidratos de Carbono y Ciclo de Acidos Tricarboxílicos. Glucólisis, Gluconeogénesis, Glucogenogénesis y Glucogenólisis. Regulación del metabolismo del glucógeno en tejidos animales. Ciclo de las pentosas. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos" / *"Carbohydrates and Tricarboxilic Acids Cycle. Glycolysis, Glyconeogenesis. Metabolic Regulation of Glycogen in animal tissues, Pentose cycle"*.

Dictado de clases teóricas. Tema: "Metabolismo del glucógeno en tejidos animales, su regulación, procesos de iniciación de la biosíntesis del glucógeno" / *"Metabolism of glycogen in animal tissues, its regulation. Studies on the initiation mechanism of glycogen biosynthesis"*. Universidad de Bar Ilan, Buenos Aires, Argentina. Octubre de 1995.

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS
NACIONALES E INTERNACIONALES /
COMMUNICATIONS PRESENTED IN
NATIONAL AND INTERNATIONAL
SCIENTIFIC MEETINGS**

- XIIth International Symposium on Glycoconjugates. Krakow, Poland, 15-20th August, 1993.
- C.R. Krisman, D.S. Tolmasky and J.A. Curá: Further studies on the primer formation of glycogen biosynthesis.
- Ateneo de Química de la Asociación Química Argentina. 6 de agosto de 1993.
- Clara R. Krisman: Proteínas nuevas involucradas en el proceso de iniciación de la biosíntesis de polisacáridos del tipo del glucógeno.
- XXIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 17-20 de noviembre de 1993.
- V.C. Lepek y C.R. Krisman.: Síntesis de glucógeno en *Agrobacterium*.
- D.S. Tolmasky y C.R. Krisman: Enzima ramificante del glucógeno en cerebro de rata.
- C.R. Krisman: Dra. Rosalía Frydman. Su trayectoria científica.
- 4th International Congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam, The Netherlands. 19-24 June 1994.
- C.R. Krisman, J.A. Curá, D.S. Tolmasky and V.C. Lepek: Studies on the starch primer formation from corn endosperm.
- XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Octubre 26-30, 1994.
- D.S. Tolmasky, J.A. Curá, V.C. Lepek, L.R. Lerner, J.C. Salerno y C.R. Krisman: Estudios relacionados con el proceso de iniciación en el almidón de maíz.
- L.R. Lerner y C.R. Krisman: Mecanismo de acción de las enzimas ramificantes involucradas en la síntesis de glucógeno y almidón.
- V.C. Lepek y C.R. Krisman: Estudios relacionados con la síntesis de glucógeno en *Agrobacterium tumefaciens*.
- D.S. Tolmasky y C.R. Krisman: Formación de glucógeno en músculo cardíaco a partir del aceptor proteico.
- First International Symposium on Sucrose Metabolism (FISSM). Mayo de 1995, Mar del Plata, Argentina.
- Jornada Anual. Asociación de Laboratorios de Alta Complejidad, Julio de 1995.
- C.R. Krisman: Detección de enfermedades genéticas vinculadas al metabolismo de hidratos de carbono. Glucogenosis.
- XXXI Reunión Anual de la SAIB (1995), Villa Giardino, Córdoba, 15-18 de noviembre.
- L.R. Lerner, S. Kadener y C.R. Krisman: Coexistencia de enzimas ramificantes en maíz dulce (sugary).
- D.S. Tolmasky, A.G. Turjansky y C.R. Krisman: Avances en el proceso de biogénesis del glucógeno en cerebro de rata.

**SOCIEDADES CIENTIFICAS /
SCIENTIFIC SOCIETIES**

C.R. Krisman:

Responsable del área de Plantas en SAIB / *Responsible of the Plants Area in SAIB* (Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica), 1994-1995.

**DISTINCIONES Y PREMIOS /
DISTINCTIONS AND AWARDS**

C.R. Krisman:

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

1995 y 1996: Directora Ejecutiva / *Executive Director*.

1995 y 1996: Miembro del Consejo Directivo / *Member of the Managing Council*.

- Miembro de la Comisión de Evaluación de antecedentes / *Member of the Evaluating Committee, CONICET (C.E.A.)*. A partir de 1993 / *Since 1993*.
- Co-Editor de Cellular and Molecular Biology, Miembro del Comité Editorial Internacional / *Member of the International Editorial Board*. A partir de 1993 / *Since 1993*.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet) / *Argentine National Research Council*.
- Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA) / *National University of Buenos Aires*.
- Comisión de Investigación del Agro (Cipagro) / *Agricultural Research Commission*.

Lab 109

Laboratorio de Neuroquímica

Laboratory of Neurochemistry

Personal Permanente / *Permanent Staff*

Héctor Carminatti

Víctor Idoyaga Vargas

Becarios Post-Doctorales / *Post-Doctoral Fellows*

Graciela Boccaccio

Tesistas / *Ph.D. Students*

Martín Radrizzani

Graduados / *Graduate Students*

Guillermo Vila Ortíz (desde / *since* 1995)

Mariana Berenstein (desde / *since* 1995)

Lilian Montero (desde / *since* 1994)

Estudiantes de Pre-grado / *Undergraduate Students*

Ximena Bedoya

Victoria Rosato Siri

Descripción del trabajo de investigación

Principalmente se ha trabajado en cuatro temas. El objetivo de nuestro proyecto de investigación está enfocado en la expresión de algunas macromoléculas de animales normales y en mutantes que participan en el desarrollo del sistema nervioso. Este trabajo se ha enfocado en algunas proteínas y glicoproteínas especiales. Enfocamos este problema estudiando la biosíntesis de estos compuestos y el transporte del mRNA de la proteína básica de mielina (MBP) en células de la glia.

a) Regulación de la síntesis de Thy1 en el cerebelo de ratón durante el desarrollo

Se ha tomado el cerebelo de una mutante de ratón (Staggerer) como un sistema modelo para estudiar la estabilización sináptica. El Thy1 es una glicoproteína de 25 kDa muy abundante en el sistema inmune y en el sistema nervioso central (especialmente corteza y cerebelo) cuya función no se conoce. Una posible hipótesis que se ha elaborado en el laboratorio es la siguiente: el Thy1 podría estar involucrado en los mecanismos de sinapsis y en particular la estabilización sináptica entre el axón de las células grano y el árbol dendrítico de las células Purkinje. Esta regulación estaría a nivel post-transcripcional. Sin embargo, evidencias previas de nuestro laboratorio indican que esta regulación parece ejercerse en parte a nivel traduccional durante el desarrollo post-natal en el cerebelo del ratón.

Es importante destacar, que en el laboratorio se ha encontrado un incremento inicial de la velocidad de la síntesis y una posterior caída entre los días 9 y 13 (post-natales), durante la etapa de estabilización sináptica entre las dendritas de las células Purkinje y las células grano. Es en este momento del desarrollo que la molécula de Thy1 está localizada según nuestros datos en las dendritas de Purkinje.

Description of research

Our research objectives focus on the role of expression of some macromolecules in the normal and abnormal development of the nervous system. We centered our study in a particular kind of proteins and glycoproteins. We approached this problem by studying the biosynthesis of these compounds and the mechanism of transport of mRNA of MBP (myelin basic protein) in glial cells.

a) Regulation of Thy 1.2 expression in mice cerebellum during synaptogenesis

To elucidate the cellular and molecular mechanism of synaptogenesis is a central issue in Neurobiology. Important advances were made in axonal pathfinding, target selection, but this is far from being the case in the process of target selection in the central nervous system.

Cell signalling is believed to play a protagonic role in circuit formation. Specifically in the cerebellum in the step of synaptic stabilization between Purkinje and granule cells, neuronal firing appears to be critical for selection through the regulation of calcium signalling mechanisms. This may be best illustrated in the case of the cerebellum of the staggerer mutant mouse, in which the coding for inositol phosphate receptor is mutated. Consequently there is an important alteration of calcium flow regulation during neuronal firing.

We reasoned that by comparing the cellular and molecular events occurring in the cerebellum of the wild type and staggerer mutant we might be able to obtain important clues leading to the elucidation of the mechanisms of synaptic stabilization. Our working hypothesis is that the expression of proteins with synaptic location taking part in the molecular regulatory mechanisms of selection are to be affected by the mutation. Thus we selected to study the Thy 1.2, a 25 kDa glycoprotein with localization in the dendrites of Purkinje cells during synapsis formation with axons of granule cells.

En el ratón se conoce una mutación en el cerebelo, que es hereditaria y afecta al movimiento y a la estabilidad del animal. Se denomina Staggerer. Se ha encontrado que esta mutación afecta únicamente a las células Purkinje y se caracteriza por una falla en la estabilización sináptica con los axones de las células grano. En el tiempo de máxima actividad de síntesis en los normales, día 12 post-natal, se ha encontrado en la mutante que la velocidad de síntesis de Thy1 es del 30% de la del tipo salvaje.

Además, en el laboratorio se han encontrado evidencias que indican alteraciones de la expresión de esta proteína en el cerebelo del ratón mutante entre los días 12 a 16 post-natales. En este estudio se utilizaron métodos de detección inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales contra Thy1.

Se ha avanzado bastante en el conocimiento de la regulación de la expresión de Thy1 y su función en la sinaptogénesis. Se ha centrado el estudio a la sinapsis de los axones de las células grano con el árbol dendrítico de las células Purkinje.

Por los datos del laboratorio se podría sugerir que la expresión del Thy1 está influenciada por señales de la estabilización entre las células grano y los Purkinje.

b) Genes regulados durante la estabilización sináptica en el cerebelo de ratón

Nuestro objetivo es aislar, secuenciar e identificar RNA mensajeros asociados con la estabilización sináptica entre células Grano y células de Purkinje.

Encontramos un RNA mensajero por la técnica de Expresión Diferencial en el período de estabilización sináptica. Esto es mediante la técnica de PCR de cDNA provenientes de RNA mensajeros con cebadores (primers) al azar combinado con poli-T, originando fragmentos de RNA mensajeros de diferentes tamaños

We found that the rate of synthesis is selectively regulated in the wild type during synaptogenesis. The regulation is expressed with a sharp increase in the rate of synthesis at P12 (Postnatal 12) and a similar drop to lower rate levels at P13.

The increase in the rate of the bulk protein population occurs several days earlier. In addition, the level of Thy 1.2 mRNA is not correlated with this sharp regulation of the rate. That is, whereas mRNA level is high the rate of Thy 1.2 synthesis is relatively low before P12 and conversely when Thy 1.2 rate of synthesis is low at P13, mRNA remains high. Consequently, the regulation of Thy 1.2 expression appears to be postrationally regulated.

Comparison of the wild type rate of Thy 1.2 synthesis with the staggerer at P12 revealed the following. The rate is 30% of the wild type in the staggerer cerebellum. This is particularly significant since the rate of bulk protein synthesis in the staggerer is the same as that of the wild type. This indicates that the rate of Thy 1.2 synthesis is selectively altered in the mutation cerebellum.

We used immunocytochemical techniques on frozen cerebellar sections to examine another aspect of Thy 1.2 expression. We found that Thy 1.2 staining was relatively very intense in all the molecular layer at P12 in the wild type. In the staggerer, however, we were not able to detect any staining for Thy 1.2 through the molecular layer. This, despite the relative high intensity of staining found in the basal nuclei of the same cerebellar sections.

These findings strongly implicate the selective involvement of Thy 1.2 in the process of synaptic stabilization. Although we do not have direct proof of a causal involvement of Thy 1.2 in regulating synaptogenesis, the possibility remains to be investigated. Furthermore, the nature of the signal triggering the regulation of the rate of Thy 1.2 synthesis and its relationship with neuronal firing is uncovered and may offer important clues to elucidate some of the mechanism of synaptogenesis in the CNS.

separables en geles de poliacrilamida. El hallazgo es confirmado por la técnica de Northern blot coincidiendo la expresión del RNA mensajero clonado aumentado a los 11 días postnatales y su secuencia fue comparada contra el Gene Bank por el método de alineación de bases (Altschul et al., 1990, Blast-NCBI). El análisis demostró una homología del 66% en 240 bases de las 315 enviadas con el RNA mensajero de una proteína de 145 kDa denominada "*Rattus norvegicus calcium-dependent actin-binding protein*" (CAPS). La función que se le atribuye a esta proteína es la de desarmar la densa red de actina que rodea la membrana plasmática para permitir la fusión de vesículas de secreción en presencia de calcio (Walent et al., 1992), necesaria para el disparo sináptico. La modulación de esta proteína sugiere un ciclo limitante durante el desarrollo del cerebelo.

c) Fosforilación de proteínas en tejidos normales y neoplásicos en el SNC

La transducción de señales via fosforilación de proteínas es un componente fundamental del programa de desarrollo en el sistema nervioso central y en la tumorigénesis. Hemos utilizado agentes químicos que se conoce afectan la diferenciación de las células nerviosas y que se ha visto que interfieren en la fosforilación de proteínas. La idea es estudiar la fosfoproteínas que intervienen en la transducción de señales.

Staurosporine (SP) es un potente inhibidor de las proteínas kinasas *in vitro*. Se han descrito algunos efectos biológicos importantes: la inducción del crecimiento de la neurita, inducción de programas de muerte celular e inhibición del crecimiento de gliomas. La identificación de las proteínas naturales, sustratos de la proteína quinasa modificada por SP pueden ser útil para dilucidar las reacciones secuenciales de proteína quinasa que controlan el crecimiento de las células neuronales y la diferenciación.

b) Genes regulated during synaptic stabilization in the mouse cerebellum

Our research objective is to isolate sequences and identify mRNAs associated with synaptic stabilization between granule and Purkinje cells.

We found a mRNA by the differential display technique at the onset of synaptic stabilization. This finding was confirmed by Northern blots. This was done by PCR amplification of the corresponding cDNA. The cDNA was then cloned in the T-vector system. Once confirmed the DNA was sequenced (Sequenase Kit version 2.0). The sequence was then analyzed according to Aschul et al. (190, Blast, NCBI, Internet). The analysis revealed a 68% homology of 240 out of 315 bases of a 145 kDa protein. The possible function attributed to this protein is to disentangle the dense actin network located near the neuronal surface (Walen et al. 1992), in the presence of calcium. Synaptic stabilization depends upon neuronal firing, and this is associated with secretion of synaptic vesicles. Thus the finding of a regulated gene at the onset of this process suggests a limiting cycle of the protein during stabilization.

c) Protein phosphorylation in normal and neoplastic tissue in the central nervous system

*Signal transduction via protein phosphorylation is a fundamental component of the developmental program of the central nervous system and tumorigenesis. We use chemical agents known to affect nerve cell differentiation and proven to interfere with protein phosphorylation to study the phosphoproteins involved in signal transduction. Staurosporine (SP) is a potent protein kinase inhibitor *in vitro* and various important biological effects have been described, among them, the induction of neurite outgrowth, induction of programmed cell death and inhibition of the growth rate of gliomas. The identification of the natural protein substrates of the protein kinases altered by SP may help to define the sequential protein*

Para encarar este problema hemos estudiado el efecto de SP en la fosforilación de proteínas en la corteza cerebral en las ratas en desarrollo y en tejido de tumores cerebrales humanos. Hemos encontrado que con la dosis de 100 nM de SP disminuye la intensidad de la fosforilación de una proteína de 55 kDa en la corteza cerebral de rata.

Un efecto nuevo y poco predecible fue que se encontró un aumento en la intensidad de fosforilación por SP en algunas proteínas.

Un análisis cuidadoso de las fosfoproteínas en tumores cerebrales en humanos muestran un patrón diferente de fosforilación en distintas regiones de determinado tumor. Esta diferencia no tiene correlación con el patrón de proteína. Se lo atribuye a diferentes actividades de protein-quinasa.

d) Mecanismos moleculares del transporte intracelular de RNAs mensajeros

El estudio del transporte y localización intracelular de mRNAs es un área floreciente en el campo del tráfico intracelular. Los oligodendrocitos -células mielinizantes del sistema nervioso central- presentan numerosas prolongaciones que se enrollan alrededor del axón, formando la cápsula de mielina. En estas prolongaciones se acumula el mRNA que codifica para MBPs (Proteína Básica de Mielina). La distribución asimétrica de los mRNAs del MBP parece ser necesaria para evitar la asociación de estos polipéptidos positivamente cargados con las membranas intracelulares y permitir su incorporación a la membrana plasmática de las células mielinizantes.

Estudios realizados en células transfectadas sugieren la existencia de mecanismos específicos por los cuales distintos tipos celulares reconocen distintos mRNAs y los dirigen a los correspondientes compartimentos citoplasmáticos. El mecanismo por el cual esto ocurre es desconocido. Se acepta en general que el transporte

kinase reaction controlling nerve cell growth and differentiation. In order to approach this problem we studied the effect of SP on protein phosphorylation in the developing rat cerebral cortex and in human brain tumor tissue obtained by stereotaxic biopsies and extensive resections. We found that SP (100 nM) decreased the intensity of phosphorylation of an approximately 55 kDa protein in the rat cerebral cortex. A novel and unexpected effect of SP was an increase in the intensity of phosphorylation of certain proteins.

The analysis of phosphoproteins in human brain tumor samples revealed a striking different phosphorylation in different regions of a single tumor. This difference does not correlate with the corresponding protein pattern and was attributed to different protein kinase activities.

d) Molecular mechanism of intracellular transport of messenger RNAs

The sorting of mRNAs is a widespread cellular strategy for protein targeting. Indeed, an asymmetric distribution of mRNAs has been observed in very different cell systems, ranging from oocytes to muscle cells. In the nervous system of vertebrates, the oligodendrocytes, which are the glial cells that synthesize the myelin, provide a striking example of polarized distribution of mRNA. The myelin is the compact multilaminar sheath that insulates axons and allows the conduction of the nervous impulse. The physiological importance of the myelin sheath is illustrated by the serious neurological disorders caused by demyelinating diseases such as multiple sclerosis.

The oligodendrocytes extend numerous membrane extensions that surround axons. These cell processes are almost devoid of cytoplasm and thus, the internal faces of its plasma membrane are in close contact. The myelin basic proteins (MBPs) are extrinsic membrane proteins located at the cytoplasmic side of the myelin forming cells.

Experiments with transfected cells suggest the existence of specific mechanisms for the targeting of mRNA to a

depende del reconocimiento de una señal en el mRNA ("zip code"), posiblemente su región 3', seguido por la acción de motores moleculares asociados al citoesqueleto.

Se ha estudiado la interacción del mRNA del MBP con el citoesqueleto de mielina. Se ha demostrado que distintos mRNA pueden ser eluidos del citoesqueleto con distintas fuerzas iónicas. Además se estudió la incorporación del mRNA de MBP en ausencia de síntesis proteica y en presencia de drogas que alteran la estabilidad del citoesqueleto.

Otro aspecto del proyecto es el de identificar otros mRNAs localizados en las prolongaciones mielinizantes. Estudios preliminares indicarían que además de los mRNA de MBP habría otros mRNA con una distribución polarizada. Si se pudiera analizar y secuenciar estos mRNA, se podría comparar la estructura primaria y secundaria de distintos mRNA localizados en un mismo compartimento subcelular (en este caso las prolongaciones mielinizantes). Se podría tener información sobre el "código postal" de estos mRNA (la región del mismo RNA con la señal para el distinto comportamiento subcelular).

Las proteínas básicas de mielina (MBP) son los polipéptidos mayoritarios de la mielina del sistema nervioso central, siendo responsables de la adhesión entre las caras internas de la membrana mielinizantes de los oligodendrocitos. Estas prolongaciones mielinizantes se enrollan alrededor del axón, formando la vaina de mielina. Estudios en este laboratorio, utilizando técnicas bioquímicas han demostrado que la mielina se halla enriquecida en mRNA de MBP aproximadamente 30 veces respecto al cerebro total. Además se ha estudiado, mediante radiomarcación *in vivo* e *in vitro* con precursores de RNA, el transporte del mRNA de MBP recién sintetizado en el núcleo hasta las prolongaciones mielinizantes del oligodendrocito.

También se estudió la presencia de otros mRNA

corresponding cytoplasmic compartment. The mechanism of this process is unknown. It is accepted that the transport is mediated by a "signal" which is in the 3'untranslated region (the "zip" code).

In the lab we have studied the interaction of mRNA encoding MBP with cytoskeleton; using different salt strength it was possible to selectively elute different mRNAs. It was also shown that the incorporation of mRNA is independent of protein synthesis.

Another aspect of this project is to identify other mRNAs different from MBP in the oligodendrocyte plasma membrane. If we can isolate them and study the sequence of nucleotides, especially in the 3'region, we can get information on the "zip code". It should be very similar for different mRNA that have the same compartment location.

The MBPs are extremely basic polypeptides and therefore, have both in vitro and in vivo, a strong affinity for membranes. Therefore, the translation of the messenger encoding MBP to the myelinating region of the oligodendrocytes seems to be an important cellular strategy to prevent the non-specific binding of the MBP polypeptides to intracellular membranes. The accurate targeting of MBP mRNA allows the synthesis of MBP to be spatially restricted.

Most of the previous work to assess the spatial distribution of mRNA encoding MBP has been done by in situ hybridization analysis of both tissue sections and cultured cells.

In this project the experimental approach is based on subcellular fractionation. This approach allows the biochemical analysis of the cellular domain where the MBP mRNA are located. Using this biochemical strategy, we show that the four major MBP DNA are selectively concentrated in the myelin fraction. This might indicate that these messengers display similar localization signals that direct their translocation to the oligodendrocyte processes. The analysis of the distribution of mRNA encoding MBP revealed that all four major species appear

enriquecidos en la fracción de mielina mediante ensayos de traducción *in vitro* y "screening" diferencial. Hasta ahora no se ha podido detectar nuevos mRNA localizados en mielina, con una abundancia similar a los de MBP, pero se insiste en la búsqueda de otros componentes minoritarios.

Trabajos previos han demostrado que existen cuatro isoformas de MBP obtenidas por "splicing" de un único transcripto. Mediante análisis por PCR se ha estudiado la distribución de las cuatro especies de mRNA de MBP. Se ha demostrado que todas ellas tienen la misma localización subcelular y la misma afinidad por el citoesqueleto. Este resultado tiene interés porque indica que los exones que son expresados alternativamente no estarían involucrados en el "targeting" intracelular de estos mensajeros. Por consiguiente es razonable suponer que la señal del transporte ("código postal") se halla en alguna región del mRNA común a todos los isoformas.

associated with the myelin cytoskeleton. This fact suggests that the mRNAs remain anchored to cytoskeletal elements after their transport is accomplished.

PUBLICACIONES/ PUBLICATIONS

1. R. Tabakman, H. Carminatti and V. Idoyaga Vargas: The rate of protein exit from the rough endoplasmic reticulum in the developing rat cerebral cortex. **Anales Asoc. Quím. Argent.** **81** (1993) 245-251. Número homenaje al Dr. Roberto O. Couso.
2. J.S. Yakisich, M. Radrizzani and V. Idoyaga Vargas: Examination of the natural protein substrates affected by staurosporine in the developing cerebral cortex. **Neuroscience Letters** **180** (1994) 17-20.
3. M. Radrizzani, H. Carminatti, O. Pivetta and V. Idoyaga Vargas: Developmental regulation of Thy 1.2 rate of synthesis in the mouse cerebellum. **Journal of Neuroscience Research** **42** (1995) 220-227.
4. C. Castagnino, Yakisich J., Iacono R., Berria M., Idoyaga-Vargas V.: Growth inhibition of herpes simplex virus-type 1 in Calphostin C-treated astrocytes. **Intervirology** **38** (1995) 332-338.

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES
E INTERNACIONALES/ COMMUNICATIONS
PRESENTED IN NATIONAL AND
INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS**

- SAN: Sociedad Argentina de Neuroquímica, Córdoba, octubre de 1993.
- M. Radrizzani, O.H. Pivetta, V. Idoyaga Vargas y H. Carminatti: Regulación de la síntesis de Thy 1.2 en el cerebelo del ratón normal y el mutante Staggerer durante el desarrollo post-natal.
- SAIB: Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Iguazú, Misiones, octubre de 1994.
- M.V. Rosato Siri, L. Montero, H. Carminatti y G. Boccaccio: Targeting subcelular de RNA mensajeros de células gliales.
- M. Radrizzani, H. Carminatti y V. Idoyaga Vargas: Regulación de la expresión del Thy 1.2 en células de Purkinje.
- SAIB: Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Córdoba, octubre de 1995.
- M. Berenstein, H. Carminatti y G. Boccaccio: Fosforilación de proteínas básicas de mielina y asociación con el citoesqueleto.
- M.V. Rosato Siri, G. Boccaccio y H. Carminatti: Proteínas básicas de mielina durante el desarrollo post-natal.

**JURADO DE TESIS / MEMBERSHIP OF
PH.D. THESES TRIBUNALS**

Héctor Carminatti

- 1- Carlos E. Semino. "Biosíntesis y estructura de exopolisacáridos complejos de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xylinum*" / "*Biosynthesis and structure of complex exopolysaccharides from Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti and Acetobacter xylinum*". Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1994.
- 2- Silvana Merello. "Glicosilaciones no convencionales en protozoarios" / "*Non-conventional Glycosylations in Protozoa*". Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1995.

Víctor Idoyaga Vargas

- 1- Fernando Gabriel Princ. "Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata. Estudio sobre la porfobilinógeno deaminasa. Empleo del ácido delta-aminolebúlico como generador de especies reactivas de oxígeno" / "*Porphirin biosynthesis in the rat cerebral cortex and cerebellum. Studies on porphobilinogen deaminase. Use of delta-aminolebularic acid and generation of free radicals*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1995.

**ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE
PROMOCION DE LA CIENCIA /**
*PARTICIPATION IN SCIENCE
PROMOTING ACTIVITIES*

- Miembro de la Comisión Asesora de Ciencias Químicas del CONICET (hasta junio 1994).
- Miembro del Comité Científico Asesor del Subprograma para el Registro de Investigadores en el Exterior (hasta la fecha).
- Miembro de la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (hasta la fecha).
- Miembro del Comité Asesor del Centro Argentino Brasileiro de Biotecnología-CABBIO (hasta diciembre 1994).

SUBSIDIOS / GRANTS

- Universidad de Buenos Aires: Convocatoria 1994-1997, Código EX-265 "Mecanismos moleculares para el transporte intracelular de RNA's mensajeros".
- CONICET
PID 3951-92 "Fosforilación de proteínas y diferenciación normal y neoplásico del SNC".
PID 0532188-93 "Regulación de la biosíntesis de glicoproteínas".

Lab 112

Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos

Laboratory of Molecular Biology of Parasites

Personal Permanente / Permanent Staff

Alberto Carlos C. Frasch

Daniel Oscar Sánchez

Oscar Competella

Guido Pollevick

Tesistas / Ph. D. Students

Alejandro Buschiazzo

María Laura Cremona

Javier Di Noia

Carlos Buscaglia (desde/since 1994)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Marcelo Guerin

Estructura de los genes que codifican la familia de trans-sialidasas y mucinas y función de estas glicoproteínas en la invasión de células de mamífero por el *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* sintetiza dos grupos de glicoproteínas que han sido relacionadas con el proceso de invasión de las células de mamíferos: la trans-sialidasa y las mucinas. La trans-sialidasa le posibilita al parásito adquirir ácido siálico de glicoproteínas presentes en el medio y, de esta manera, formar epitopos sialidados que estarían involucrados en la interacción con aceptores presentes en la célula huésped. Los aceptores del ácido siálico en el trypanosoma son una familia de mucinas y lipopeptidosfosfoglicanos. Nuestro grupo ha identificado y analizado los genes que codifican las familias de la trans-sialidasa y la proteína(s) que formaría el "core" de las mucinas. Actualmente estamos analizando la estructura de los genes que codifican ambas familias de proteínas, identificando las moléculas producidas a partir de estos genes y estudiando su importancia en la infección celular mediante la producción de trypanosomas transgénicos, identificación de inhibidores o moléculas que compitan con su posible función, incluyendo anticuerpos, y experimentos de protección en animales de laboratorio. En paralelo, se ha comenzado con la identificación de genes que codifican la neuraminidasa de otros parásitos protozoarios, como el *Trypanosoma rangeli* y la *Tritrichomonas foetus*.

Proyecto genoma del *Trypanosoma cruzi*

Nuestro grupo está involucrado en el proyecto genoma del *Trypanosoma cruzi* recientemente lanzado por el "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases" (TDR) de la Organización Mundial de la Salud. En colaboración con los grupos de los Dres. A. Ruiz (Buenos Aires), J. Hoheisel (Heidelberg) y U. Pettersson (Uppsala) hemos caracterizado el cariotipo

Structure of the genes coding for the family of trans-sialidases and mucins and function of these glycoproteins in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi codes for two groups of glycoproteins that have been related with the process of host cell invasion: the trans-sialidase and mucins. The trans-sialidase allows the parasite to acquire sialic acid from glycoproteins in the medium. The sialic acid is incorporated into parasite mucins, forming a sialylated epitope that was suggested to interact with receptors/acceptors in the host cell allowing parasite invasion. Our group has identified and analyzed the genes encoding members of the family of trans-sialidases and the core protein of mucins. We are now analyzing the structure of the different members of these families, identifying the molecules encoded by these genes, studying their importance in cellular infection through the obtention of transgenic parasites, and identifying inhibitors and molecules that could interfere with their vital function, including antibodies. Characterization of the genes encoding the neuraminidases in the protozoan parasites *Trypanosoma rangeli* and *Tritrichomonas foetus* has been started.

***Trypanosoma cruzi* genome project**

Our group is involved in the *Trypanosoma cruzi* project recently launched by the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) from the World Health Organization. In collaboration with Drs. A. Ruiz (Buenos Aires), J. Hoheisel (Heidelberg) and U. Pettersson (Uppsala) we have characterized the karyotype of the selected reference strain of *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) and constructed a cosmid library that is being used for the construction of a physical map of the parasite genome.

de la cepa de referencia seleccionada (CL Brener) y hemos construido una genoteca en cosmidos que está siendo utilizada para la construcción de un mapa físico del genoma del parásito.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

A) Publicaciones originales / Original publications

- 1- P. Varela, M. Rivas, N. Binsztein, M.L. Cremona, P. Herrmann, O. Burrone, R.A. Ugalde and A.C.C. Frasch: Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from the Argentine outbreak by PCR for ctx A1 and ctx A2-B. **FEBS Lett.** **315** (1993) 74-76.
- 2- J. Martínez, O. Campetella, A.C.C. Frasch and J.J. Cazzulo: The reactivity of sera from Chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. **Immunol. Lett.** **35** (1993) 191-196.
- 3- M.A. Ferrero-García, S.E. Trombetta, D.O. Sánchez, A. Reglero, A.C.C. Frasch and A.J. Parodi: The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins. **Eur. J. Biochem.** **213** (1993) 765-771.
- 4- G. Pollevick, D.O. Sánchez, O. Campetella, M. Sousa, U. Hellman, U. Pettersson, J.J. Cazzulo and A.C.C. Frasch: Members of the SAPA/trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. **Mol. Biochem. Parasitol.** **59** (1993) 171-174.
- 5- A. Buschiazzo, M.L. Cremona, O. Campetella, A.C.C. Frasch and D.O. Sánchez: Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Mol. Biochem. Parasitol.** **62** (1993) 115-116.
- 6- M.B. Reyes, G.D. Pollevick and A.C.C. Frasch: An unusually small gene encoding a putative mucin-like glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Gene** **140** (1994) 139-140.
- 7- O.E. Campetella, A.D. Uttaro, A.J. Parodi and A.C.C. Frasch: A recombinant *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. **Mol. Biochem. Parasitol.** **64** (1994) 337-340.
- 8- M.S. Leguizamón, O.E. Campetella, S.M. González Cappa and A.C.C. Frasch: Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. **Infect. Immun.** **62** (1994) 3441-3446.
- 9- P. Varela, G. Pollevick, M. Rivas, N. Binsztein, A.C.C. Frasch and R.A. Ugalde: Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. **J. Clin. Microbiol.** **32** (1994) 1246-1248.
- 10- A. Pastini, S.R. Iglesias, V.C. Carricarte, M.E. Guerin, D.O. Sánchez and A.C.C. Frasch: Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful to screening donated blood and diagnosing Chagas disease. **Clinical Chemistry** **40** (1994) 1893-1897.

- 11- M.S. Leguizamón, O.E. Campetella, G. Russomando, M. Almirón, I. Guille, S.M. González Cappa and A.C.C. Frasch: Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. **J. Infect. Dis.** **170** (1994) 1570-1574.
- 12- E.E. Jazin, E.J. Bontempi, D.O. Sánchez, L. Aslund, J. Henriksson, A.C.C. Frasch and U. Pettersson: *Trypanosoma cruzi* exoantigen is a member of a 160 kDa gene family. **Parasitology** **110** (1995) 61-69.
- 13- M.L. Cremona, D.O. Sánchez, A.C.C. Frasch and O. Campetella: A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. **Gene** **160** (1995) 123-128.
- 14- J. Henriksson, B. Porcel, M. Rydaker, V. Ruiz Sabaj, N.A. Galanti, J.J. Cazzulo, A.C.C. Frasch and U. Pettersson: Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **73** (1995) 63-74.
- 15- J.M. Di Noia, D.O. Sánchez and A.C.C. Frasch: The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. **J. Biol. Chem.** **270** (1995) 24146-24149.

B) Revisiones bibliográficas / Review articles

- 1- A.C.C. Frasch, M.B. Reyes and D.O. Sánchez: Diagnosis of Chagas disease: present and future. In: Chagas' Disease and the Nervous system. **Pan American Health Organization Scientific Publication Nº 547** (1994) pp. 53-60.
- 2- A.C.C. Frasch: Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. **Parasitology** **108** (Suppl) (1994) 37-42.
- 3- O. Campetella, D. Sánchez, M.B. Reyes, G.D. Pollevick, A. Buschiazzi, M.L. Cremona, M. Guerin, J. DiNoia and A.C.C. Frasch: Trans-sialidase and the superfamily of *Trypanosoma cruzi* antigens. **Biology of Parasitism** (E. Ehrlich, A. Nieto Eds., Montevideo, Uruguay), (1994) pp. 187-196.
- 4- A.C.C. Frasch: Trans-sialidase in the insect-vector stages of African and American trypanosomes. **Parasitology Today** **10** (1994) 170-171.

A.C.C. Frasch:

- 1- Diagnosis of blood-borne Disease. International Atomic Energy Agency Meeting, Río de Janeiro, Brazil. Polymerase chain reaction in the identification of *Toxoplasma gondii*. 1993.
- 2- Asociacion Latinoamericana de Inmunología. Santiago, Chile. Inmunogenicidad de la trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. 1993.
- 3- "Functional Molecules on the Surface of Protozoan Parasites". City University London. London, UK. The

PRESENTACIONES POR INVITACION
EN CONGRESOS CIENTIFICOS /
INVITED PRESENTATIONS IN
SCIENTIFIC MEETINGS

Wellcome Trust Lecture: the trans-sialidase and the superfamily of *Trypanosoma cruzi* antigens. 1993.

- 4- Encuentro Iberoamericano sobre Estudios Moleculares. Caracas, Venezuela. Trans-sialidasa e infectividad del *Trypanosoma cruzi*. 1993.
- 5- 27th Trypanosomiasis Seminar, London School of Hygiene and Tropical Medicine. London, UK. 1993.
- 6- International Workshop on Biology of Parasitism. Solis, Uruguay. Trans-sialidase and the superfamily of *Trypanosoma cruzi* antigens. 1993.
- 7- The Second Santiago Southern Summer Symposia. Santiago, Chile. The relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. 1994.
- 8- "From spontaneous generation to molecular evolution". The Year of Louis Pasteur Symposium. Río de Janeiro, Brazil. 1995.

CONFERENCIAS DICTADAS EN INSTITUCIONES DEL EXTERIOR / LECTURES DELIVERED AT FOREIGN INSTITUTIONS

A.C.C. Frasch:

- 1- Tropical Disease Research, World Health Organization, Geneva, Switzerland. The genome of *Trypanosoma cruzi* and the Pathogenesis of Chagas Disease. 1993.
- 2- Institute of Genetics, University of Glasgow, Glasgow, Scotland. *Trypanosoma cruzi* and how to succeed in establishing the infection in mammals. 1993.
- 3- Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK. *Trypanosoma cruzi* antigens and the parasite trans-sialidase. 1993.

SUBSIDIOS /GRANTS

A.C.C. Frasch:

- 1- Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC) 1993-1995.
- 2- Universidad de Buenos Aires, 1993-1995.
- 3- Tropical Disease Research, World Health Organization, 1993-1995.
- 4- Pan American Health Organization, 1993-1994.
- 5- International Atomic Energy Agency, Austria, 1993-1995.
- 6- Fundación Antorchas, Argentina, 1993.
- 7- National Research Council, Argentina, 1993.

O. Campetella:

- 1- Fundación Antorchas, Argentina, 1993.
- 2- Tropical Disease Research, World Health Organization, 1993-1995.

D. Sánchez:

- 1- Fundación Antorchas, Argentina, 1993.
- 2- Universidad de Buenos Aires, 1993-1995.

**CURSOS DE POST-GRADO /
POST-GRADUATE COURSES**

A.C.C. Frasch:

Pre- and post-graduate course on "Molecular Genetics", Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Buenos Aires.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

A.C.C. Frasch:

- 1- Doctor en Ciencias Biológicas Guido Pollevick. "Estructura, organización y expresión de los genes que codifican la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*" / "*Structure, organization and expression of genes which codify Trypanosoma cruzi trans-sialidase*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1993.
- 2- Doctora en Ciencias Biológicas María Susana Leguizamón. "Evaluación biológica de antígenos definidos de *Trypanosoma cruzi*" / "*Biological evaluation of Trypanosoma cruzi defined antigens*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1995.

**ACTIVIDADES EN ORGANISMOS
DE PROMOCION DE LA CIENCIA /
ACTIVITIES IN SCIENCE
PROMOTION INSTITUTIONS**

A.C.C. Frasch:

- 1- Chairman of the Steering Committees on Chagas Disease. TDR, World Health Organization. Geneva. 1993.
- 2- Member of the Committee for Chemical Sciences of the National Research Council, Argentina. 1994.
- 3- Chairman of the Committee on Parasite Genomes and Coordinator of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project, TDR, World Health Organization, Geneva, since 1994.
- 4- Member of the Editorial Board of Parasitology Today (UK) and Memorias do Instituto Oswaldo Cruz (Brazil).

Lab 201

Laboratorio de Regulación de Síntesis Proteica y Proliferación en Bacterias y Parásitos

Laboratory of Regulation of Protein Synthesis and Proliferation in Bacteria and Parasites



Personal permanente / *Permanent Staff*

Israel D. Algranati

Nélida S. González

Tesistas / *Ph.D. Students*

Carolina Ceriani

Inés G. Fastame

Cecilia P. Sánchez (hasta Febrero / *until February 1995*)

Personal Técnico / *Technical Staff*

Liliana Sferco

Juan Mucci

Poliaminas y la regulación de la síntesis proteica y la proliferación en bacterias y células eucarióticas

1) Metabolismo de poliaminas y síntesis de macromoléculas en tripanosomátidos

Los niveles endógenos de poliaminas pueden regular la proliferación y diferenciación celular. En nuestro laboratorio hemos investigado la posibilidad de controlar la multiplicación de algunos parásitos provocando el ayuno del "pool" intracelular de poliaminas. Con este objetivo hemos agregado la droga difluormetilornitina (DFMO) (un inhibidor irreversible de la enzima ornitina decarboxilasa) a cultivos de *Leishmania mexicana* en medios sintéticos. En estas condiciones se detiene la proliferación de los parásitos después de varios pasajes en presencia de la droga y la multiplicación celular sólo puede reiniciarse por agregado de poliaminas exógenas. Después de obtener estos resultados hemos estudiado la ornitina decarboxilasa (ODC), primera enzima en el camino biosintético de las poliaminas en la mayoría de los parásitos, y hemos realizado su caracterización bioquímica y molecular. Hemos investigado las propiedades catalíticas de la enzima obtenida de promastigotes de *Leishmania mexicana* y se ha analizado en particular las interacciones de la ODC con el cofactor piridoxal 5'fosfato (PLP) y con el inhibidor DFMO. La remoción total del PLP de las preparaciones enzimáticas permitió la obtención de apoenzima inactiva que demostró un requerimiento absoluto de la readición del cofactor para recuperar la actividad. La reformación de la holoenzima indicó la participación de un proceso dependiente del tiempo y la temperatura.

Recientemente hemos seleccionado líneas celulares de *Leishmania mexicana* resistentes a DFMO y estamos investigando los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de la resistencia a la droga.

Polyamines and the Regulation of Protein Synthesis and Proliferation in Prokaryotic and Eucaryotic cells

1) Polyamine metabolism and macromolecular synthesis in trypanosomatids

It is well known that polyamine endogenous levels can regulate cell proliferation and differentiation. We have investigated the possible control of several parasites multiplication by inducing the depletion of their intracellular pool of polyamines. With this purpose we have added difluoromethylornithine (DFMO) (an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase) to cultures of *Leishmania mexicana* grown in synthetic media. Under these conditions parasite proliferation was arrested after several passages in the presence of the drug and cell multiplication could only be resumed by addition of exogenous polyamines. After these results we have carried out the biochemical and molecular characterization of ornithine decarboxylase (ODC), the first enzyme in the polyamine biosynthetic pathway occurring in the majority of protozoan organisms. We have studied the catalytic properties of the enzyme from *Leishmania mexicana* promastigotes as well as its interaction with the cofactor pyridoxal 5'phosphate (PLP) and the inhibitor DFMO. The complete removal of PLP yielded the apoenzyme which showed an absolute requirement for the cofactor to recover the enzyme activity. The holoenzyme restoration showed the involvement of time and temperature-dependent processes.

Recently we have selected DFMO-resistant cell lines of *Leishmania mexicana*. The molecular mechanisms involved in the drug resistance are currently under investigation. In addition ODC from *Crithidia fasciculata* has been cloned and its sequencing will be completed in the near future.

We have also studied the regulation of polyamine uptake in *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* and

Por otra parte se ha clonado la enzima ODC de *Crithidia fasciculata* y se está analizando su secuencia nucleotídica.

También hemos estudiado la regulación del transporte de poliaminas en *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia fasciculata*. Hemos podido demostrar que el transportador de putrescina en *Leishmania* es una proteína específica y estable que puede ser reversiblemente inactivada por una proteína represora relativamente inestable.

2) Efectos de las poliaminas sobre la fidelidad de la síntesis proteica y la acción de antibióticos en bacterias

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado el rol esencial de las poliaminas en la biogénesis y ensamblado de las subunidades ribosomales. Más recientemente hemos comprobado que las poliaminas afectan el control de la fidelidad de la traducción y la acción de antibióticos aminoglucósidos en bacterias. El aumento *in vivo* de la frecuencia de errores de la síntesis proteica provocados por la presencia de estreptomycin se observó solamente en bacterias con niveles intracelulares normales de poliaminas.

3) Efectos de poliaminas en el proceso de metástasis tumoral

Las drogas antipoliámínicas como el DFMO han demostrado ser útiles para inhibir la metástasis de tumores. Dado que la angiogénesis es una de las etapas involucradas en el proceso de metástasis nos ha interesado investigar el requerimiento de poliaminas para la inducción de angiogénesis por células tumorales o linfocitos del bazo de animales con tumores. En ambos casos hemos demostrado que el DFMO suprime la angiogénesis inducida y que el efecto puede ser revertido por adición de poliaminas exógenas.

Crithidia fasciculata. We have shown that putrescine transporter in *Leishmania* is a stable and specific protein which can be reversibly inactivated by a relatively unstable repressor.

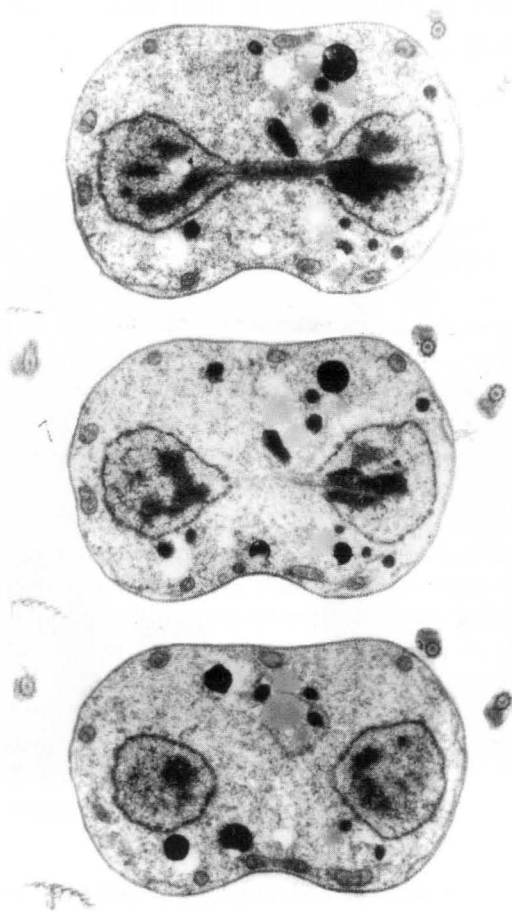
2) Effects of polyamines on the fidelity of protein synthesis and antibiotic action in bacteria

The essential role of polyamines in the biogenesis of ribosomal subunits has been found long ago in our laboratory.

More recently we have demonstrated the polyamine requirement for the control of fidelity in bacterial translation and for the normal action of aminoglycoside antibiotics. The increase of *in vivo* mistranslation frequency elicited by streptomycin was only observed in polyamine-supplemented bacteria.

3) Effects of polyamines on the process of tumor metastasis

It has been previously shown that antipolyamine drugs as DFMO were able to inhibit the metastatic spreading of tumors. Since angiogenesis is one of the steps involved in the process of metastasis we have investigated the requirement of polyamines for angiogenesis induction by tumor cells and spleen lymphocytes from tumor-bearing animals. Our results have demonstrated that DFMO inhibited tumor metastasis not only by affecting cell proliferation but also by suppression of the angiogenesis initiated by tumor cells and activated lymphocytes. The inhibition of angiogenesis could be reverted by the addition of exogenous polyamines.



Nuclear division of *Leishmania mexicana* promastigotes. Courtesy of Prof. Alberto J. Solari, School of Medicine, University of Buenos Aires, Argentina.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- M. Monte, S. Klein, M.A. Jasnís, L. Davel, I.D. Algranati y E.S. de Lustig: Inhibition of lymphocyte and tumor-induced angiogenesis by the administration of difluoromethylornithine. **Cancer J.** 6 (1993) 147-151.
- 2- N.S. González, C. Ceriani e I.D. Algranati: Transporte de poliaminas en tripanosomátidos. **Anales Asoc. Quím. Argentina** 81 (1993) 117-125.
- 3- H.G. Natri, I.G. Fastame and I.D. Algranati: Polyamines modulate streptomycin-induced mistranslation in *E. coli*. **Biochim. Biophys. Acta** 1216 (1993) 455-459.
- 4- M.A. Jasnís, S. Klein, M. Monte, L. Davel, E.S. de Lustig and I.D. Algranati: Polyamines prevent DFMO-mediated inhibition of angiogenesis. **Cancer Lett.** 79 (1994) 39-43.
- 5- I.G. Fastame and I.D. Algranati: Inhibition of *in vivo* transcription by actinomycin D treatment of EDTA-permeabilized *E. coli*. Effects on bacteriophage proliferation. **Anal. Biochem.** 222 (1994) 163-167.
- 6- N.S. González and I.D. Algranati: Regulation of putrescine uptake in *Leishmania mexicana* promastigotes. **Cell. Mol. Biol.** 40 (1994) 907-914.
- 7- C.P. Sánchez, C. Sidrauski, S. Menezes Freire, N.S. González and I.D. Algranati: Ornithine decarboxylase from *Leishmania mexicana* promastigotes: interaction with pyridoxal 5'-phosphate and α -difluoromethylornithine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 212 (1995) 396-403.

TESIS DOCTORALES / DOCTORAL THESES

- 1- Cecilia P. Sánchez: "Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos. Ornitina decarboxilasa de *Leishmania mexicana*" / "Metabolism of polyamines in trypanosomatids. Ornithine decarboxylase from *Leishmania mexicana*". Universidad de Buenos Aires. Calificación: sobresaliente. Director: I.D. Algranati. 1993.
- 2- Inés G. Fastame: "Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos" / "Regulation of protein synthesis in bacteria and parasites". Universidad de Buenos Aires. Calificación: sobresaliente. Director: I.D. Algranati. 1995.

ACTIVIDADES DOCENTES / TEACHING ACTIVITIES

Israel D. Algranati

- "Regulación de la expresión genética" (correspondiente a un curso de postgrado de la Universidad de Río Cuarto, Córdoba) / "Regulation of gene expression" (corresponding to a postgraduate course of the University of Río Cuarto, Córdoba).

**ASISTENCIA A CONGRESOS Y
REUNIONES CIENTIFICAS /
SCIENTIFIC MEETINGS**

- XXIX Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Córdoba, 1993.
 - I.G. Fastame, H.G. Nastri e I.D. Algranati: Efecto de poliaminas en la fidelidad de la traducción y en la acción de antibióticos aminoglucósidos.
 - N.S. González e I.D. Algranati: Regulación de la captación de putrescina en *L. mexicana* promastigotes.
- IV Congreso Regional de Protozoología y XX Reunión de Investigadores de Chagas, San Fernando del Valle de Catamarca, 1993.
 - N.S. González e I.D. Algranati: Regulación de los niveles endógenos de poliaminas y control de la proliferación de tripanosomátidos.
- XXX Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Misiones, 1994.
 - C.P. Sánchez, N.S. González e I.D. Algranati: Amplificación de la ornitina decarboxilasa de *Leishmania mexicana*.
 - Inés G. Fastame, Ezequiel Labreveux e I.D. Algranati: Caracterización de un inhibidor de la traducción en extractos de *Leishmania mexicana*.
- XXXI Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Córdoba, 1995.
 - C. Ceriani e I.D. Algranati: Inestabilidad de la ornitina decarboxilasa de *Crithidia fasciculata* y resistencia a difluorometilornitina.
 - I.G. Fastame e I.D. Algranati: Purificación y caracterización de un inhibidor de la traducción aislado de extractos de *Leishmania mexicana*.
 - C.P. Sánchez, J. Mucci, N.S. González e I.D. Algranati: Selección en un paso de cepas de *L. mexicana* resistentes a altas concentraciones de DFMO y amplificación del gen de ODC.

SEMINARIOS / SEMINARS

I.D. Algranati

- Polyamine metabolism and control of proliferation in *Leishmania mexicana*. Pasteur Institute, October, 1993.
- Amplification of ornithine decarboxylase gene in *Leishmania mexicana*. Pasteur Institute, October, 1995.
- Polyamine metabolism, control of proliferation and development of drug resistance in parasites. Institute of Biochemistry, University of Verona, October, 1995.

**INVITACIONES A CONGRESOS
INTERNACIONALES / INVITATIONS
TO INTERNATIONAL MEETINGS**

I.D. Algranati fue invitado a participar como coordinador en una sesión de la Conferencia Gordon sobre Poliaminas (junio de 1993). / *I.D. Algranati has been invited as Discussion Leader to the Gordon Research Conference on Polyamines (June 1993).*

Nélida S. González

Sweden-Argentina-Chile-Uruguay Symposium, Molecular, Biochemical and Immunological Approaches to

Parasitic Diseases (SAREC). Montevideo, Uruguay, 1994.

"Regulation of putrescine uptake in *L. mexicana* trypomastigotes". Nélica S. González e Israel D. Algranati.

PREMIOS Y DISTINCIONES / PRIZES AND DISTINCTIONS

I.D. Algranati

Premio Konex 1993 de Bioquímica y Microbiología / 1993 Konex Prize in Biochemistry and Microbiology.

ESTADIAS EN LABORATORIOS EXTRANJEROS / STAGES IN FOREIGN LABORATORIES

I.D. Algranati trabajó en la preparación de sondas específicas del gen de ornitina decarboxilasa de *Leishmania* y realizó parte de los estudios de amplificación y resistencia a la droga DFMO durante los meses de octubre de los años 1993, 1994 y 1995 en el laboratorio de Regulación de la Expresión Genética de Eucariotes (Instituto Pasteur, París). Estas estadias corresponden a un acuerdo INSERM-CONICET (1993-1996). El Dr. Mario Zakín, contraparte francesa del acuerdo ha trabajado en Buenos Aires durante varias semanas todos los años mencionados.

C. Ceriani realizó el clonado del gen de ornitina decarboxilasa de *Crithidia fasciculata* durante su estadía en el Departamento de Fisiología y Biofísica de la Universidad de Lund (Suecia) durante los meses de noviembre y diciembre de 1994.

I.D. Algranati spent one month every year from 1993 to 1995 working at the Laboratory of Regulation of Gene Expression in Eukaryotic Cells (Pasteur Institute, Paris) as part of the Agreement between INSERM and CONICET. During these periods Dr. Algranati has prepared Leishmania ornithine decarboxylase specific probes for the subsequent PCR amplification and cloning of the gene in the studies on DFMO resistance of parasites. Dr. M. Zakín, the French counterpart of the agreement spent several weeks every year at Dr. Algranati's Laboratory.

C. Ceriani has cloned the ornithine decarboxylase gene of Crithidia fasciculata during her stay at the Department of Physiology and Biophysics of the Lund University (Sweden) in November-December 1994.

SUBSIDIOS RECIBIDOS / GRANTS OBTAINED

- Fundación Antorchas / Antorchas Foundation (1993).
- SAREC (1993-1995).
- United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) (1993-1995).
- CONICET / National Research Council (1993).
- Universidad de Buenos Aires (1993-1995).

Lab 202

Laboratorio de Poliaminas en Bacterias y Levaduras

Laboratory of Polyamines in Bacteria and Yeast



Personal Permanente / *Permanent Staff*

Sara H. Goldemberg

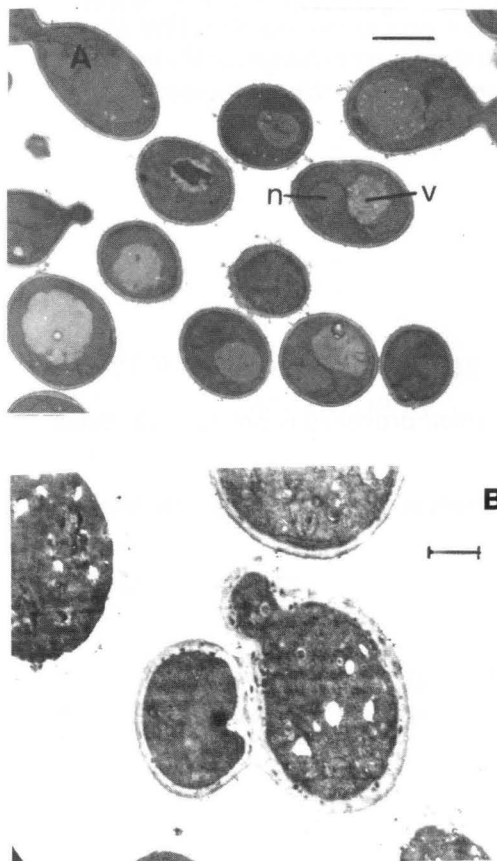
Estudiantes de Pre-grado / *Undergraduate Students*

Miriam Souto (1993-1994)

Paula Semerdjian (desde / *since* 1993)

Gabriela Di Niello (desde / *since* 1994)

Maximiliano López Mic (desde / *since* 1995)



Electron micrograph of polyamine-requiring *S. cerevisiae*

A - Polyamine-supplemented cells
B - Polyamine-depleted cells

Poliaminas en microorganismos

- Estudios previos del laboratorio han demostrado que el contenido en poliaminas de *E. coli* BGA8, una mutante que no puede sintetizar putrescina, determina los niveles de guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato (ppGpp) y la respuesta estricta al ayuno de aminoácidos o a la disminución de la fuente de energía.

Estudios cinéticos con varias cepas derivadas de *E. coli* BGA8 con mutaciones adicionales en *relA* (locus de síntesis de ppGpp) y *spoT* (locus de degradación de ppGpp), sugieren un rol importante de las policationes especialmente en la degradación de ppGpp, y también en su síntesis a través de la ppGpp sintetasa I (PSI), la enzima dependiente de ribosomas codificada por el gen *relA*.

Con el objeto de correlacionar los menores niveles de ppGpp inducidos por ayuno de aminoácido en bacterias cultivadas sin poliamina, con posibles diferencias en PSI, se estudió la síntesis *in vitro* del nucleótido. Comparando la enzima obtenida de ambos tipos de cultivo no se observaron mayores diferencias, salvo una distribución subcelular modificada, y una mayor actividad específica cuando PSI provenía de bacterias ayunadas en poliaminas. El ensamblado defectuoso de los ribosomas 70S en estas condiciones, ya estudiado en el laboratorio, podría influir en las propiedades alteradas de la enzima.

- Se está estudiando la posible participación de las poliaminas en las modificaciones inducidas por la entrada en fase estacionaria, provocadas por la limitación de fosfato o de glucosa en células de *E. coli* BGA8 suplementadas o no con poliaminas. Los cambios, seguidos por electroforesis bidimensional, indican algunas diferencias en el patrón de proteínas que aparecen en ambos tipos de cultivo.

Polyamines in microorganisms

- Previous results from our laboratory have indicated that the polyamine content of *E. coli* BGA8, a mutant unable to synthesize putrescine, conditions the levels of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and the stringent response to amino acid starvation or energy source downshift.

Kinetic studies with several BGA8 derivatives carrying additional mutations in *relA* (ppGpp synthesis locus) and *spoT* (ppGpp degradation locus), strongly suggest an important role of the polycations mainly in the degradation of ppGpp and also in its synthesis mediated by ppGpp synthetase I (PSI), the ribosome-dependent enzyme encoded by the *relA* gene.

In order to correlate the decreased levels of ppGpp evoked by amino acid starvation in polyamine-depleted bacteria, with possible differences in PSI, the *in vitro* formation of the nucleotide was studied. A comparison of the enzyme obtained from both types of culture showed no major differences, except for a modified subcellular distribution and a larger specific activity when PSI was prepared from polyamine-depleted bacteria. The previously reported incorrect assembly of 70S ribosomes under these conditions might have a role in the altered properties of the enzyme.

- The possible involvement of polyamines in the modifications induced by entry into stationary phase elicited by phosphate or glucose limitation is being studied in polyamine-supplemented and unsupplemented cells of *E. coli* BGA8. The changes, monitored by two-dimensional gel electrophoresis, indicate some differences in the pattern of proteins evoked in both types of culture.
- E. coli* BGA8 cells in the absence of polyamines show a much higher survival capacity to similar levels of streptomycin than the corresponding putrescine-

- En ausencia de poliaminas *E. coli* BGA8 muestra una capacidad mucho mayor de supervivencia a los mismos niveles de estreptomicina que en presencia de los policationes. Analizando las proteínas sintetizadas durante un pulso en células tratadas con estreptomicina se observan diferencias con respecto al control sin antibiótico en las fracciones periplásmica y residual de las bacterias con poliaminas. Por el contrario, los cultivos de BGA8 ayunados en los policationes dan casi los mismos resultados en la fracción periplásmica después del tratamiento con estreptomicina, y se observan algunos cambios en la fracción residual (diferentes de los encontrados en presencia de putrescina).

supplemented cultures. Analysis of newly synthesized proteins in cells treated with streptomycin showed differences in the pattern of the periplasmic and residual fractions in polyamine-unstarved bacteria. Polyamine-depleted BGA8, on the contrary, gave almost similar patterns in the periplasmic fraction after streptomycin treatment, and with some changes in the residual fraction (different from those evoked in the presence of putrescine).

PUBLICACIONES ORIGINALES / ORIGINAL PUBLICATIONS

- 1- P. Barderi y S.H. Goldemberg: Alteraciones en la pared de *S. cerevisiae* provocadas por falta de poliaminas. **Anales Asoc. Quím. Argent.** **81** (1993) 353-357.
- 2- S.H. Goldemberg: A role for polyamines in the control of ppGpp levels in *Escherichia coli*. **Cell. Mol. Biol.** **40** (1994) 899-905.

PRESENTACIONES POR INVITACION EN CONGRESOS CIENTIFICOS / INVITED PRESENTATIONS IN SCIENTIFIC MEETINGS

- 10th Gordon Research Conference on Polyamines, New London (N.H., USA), June 1993.
- Coordinadora de la sesión "Prokaryotes and other non-mammalian systems": "Polyamine involvement in ppGpp cycle", S.H. Goldemberg.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS CIENTIFICOS / COMMUNICATIONS PRESENTED IN SCIENTIFIC MEETINGS

- XXIX Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Investigación Bioquímica, Carlos Paz (Córdoba, Argentina), Noviembre 1993.
- S.H. Goldemberg: Participación de las poliaminas en el ciclo de ppGpp.
- XXX Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Investigación Bioquímica, Iguazú (Misiones, Argentina), Octubre 1994.
- S.H. Goldemberg: Regulación del metabolismo de guanósina tetrafosfato en *E. coli*.

JURADOS DE CONCURSOS DOCENTES
/ MEMBERSHIP OF TRIBUNALS FOR
THE APPOINTMENT OF UNIVERSITY
TEACHERS

S.H. Goldemberg

- Concurso regular Profesor Adjunto Dedicación simple. Química Biológica, Area Microbiología / *Assistant Professor, part-time, Biological Chemistry, Area Microbiology*. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Mayo de 1995.
- Selección interna Ayudante de 2da. Áreas Química Biológica y Biología Molecular / *Assistant teacher, 2nd class, Biological Chemistry and Molecular Biology*, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Octubre de 1995.
- Concurso regular Profesor Adjunto Dedicación exclusiva. Área Micología / *Assistant Professor, Full-time, Mycology*, Departamento de Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Noviembre de 1995.

VISITAS CORTAS A LABORATORIOS /
SHORT VISITS TO LABORATORIES

S.H. Goldemberg

Dr. Roberto Kolter, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA, 1993.

SUBSIDIOS / GRANTS

S.H. Goldemberg

CONICET (IIBBA), 1993.

Lab 204

Laboratorio de Biosíntesis de Polisacáridos Complejos y de Compuestos Vinculados en Bacterias

*Laboratory of Complex Carbohydrates
Biosynthesis and Related Subjects, in Bacteria*



Personal Permanente / Permanent Staff

Marcelo A. Dankert

Personal Técnico Profesional / Technical Staff

Irma O. Mastronardi

Tesistas / Ph.D. Students

Daniel E. Bassi

Carlos A. Semino (hasta Abril / until April 1994)

Adrián Vojnov

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Mariano Salibe (Seminario de Licenciatura/ Master Degree Seminar)

Biosíntesis de polisacáridos complejos y de compuestos vinculados, en bacterias

Un gran número de bacterias produce exopolisacáridos (EPS) que son liberados al medio circundante. A estos compuestos se les han atribuido una serie de funciones: patogenicidad, capacidad de asociación a un huésped particular, protección contra la desecación, contra bacteriófagos, etc.

La estructura química de estos EPS es en general compleja: pueden contener varios azúcares diferentes, substituyentes no glicosídicos y unidades repetitivas relativamente grandes (hasta 17 azúcares). Las soluciones acuosas de algunos de estos EPS tienen propiedades reológicas de interés para la industria. Varios de estos EPS se utilizan regularmente como espesantes y/o emulsificantes en las más variadas industrias: de la alimentación, farmacéutica, petrolera, etc.

La biosíntesis *in vitro* de algunos de estos EPS se estudia en este laboratorio, utilizando varios sistemas bacterianos.

Uno de esos proyectos se refiere al estudio de la síntesis del xantano, un EPS producido por una bacteria patógena de plantas, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. El camino metabólico principal ya ha sido descrito en este laboratorio pero faltan aclarar todavía algunos detalles. La importancia industrial de este EPS es enorme. En este laboratorio se identificó también a otro EPS de estructura similar, el acetano, producido por el gram negativo *Acetobacter xylinum*. Su biosíntesis también está en estudio.

Otro proyecto está dedicado a investigar la biosíntesis de EPS en varias cepas de rizobios. Estas bacterias se caracterizan por infectar las raíces de ciertas plantas, casi específicamente leguminosas, y formar en ellas pequeños tumores o nódulos en los que el nitrógeno atmosférico se transforma en compuestos útiles a la

Biosynthesis of complex carbohydrates and of related subjects in bacteria

A considerable number of bacteria produce polysaccharides that are freely liberated outside the cell. A series of functions have been assigned to these exopolysaccharides (EPS): pathogenicity, association with a particular host, protection against desiccation and bacteriophages, etc.

The structure of these EPS is generally complex, since they may contain several different sugars, non-glycosidic substituents, and large repeating units (up to 17 sugars).

Water solutions of some of these EPS have rheological properties of industrial interest. Several EPS are used as thickeners and emulsifiers in a wide variety of activities such as food, pharmaceutical and oil industries.

The biosynthesis of some of these EPS is being studied in this laboratory using several bacterial systems.

One project involves the study of the biosynthesis of xanthan gum, and EPS produced by the plant pathogen *Xanthomonas campestris*. The main steps have already been described in work from this laboratory but many details are still unclear. This EPS has a number of industrial applications. A structurally related EPS, acetan, produced by the gram negative *Acetobacter xylinum* was first described in this laboratory. Its synthesis is also being studied here.

Another project investigates the synthesis of EPS in several strains of *Rhizobium*. These bacteria infect the roots of plant legumes to form nodules in which the atmospheric nitrogen is transformed into compounds useful to both the plant and the bacteria. This symbiotic process, called "nitrogen fixation", implies a "communication system" between the plant and the bacteria. This is accomplished by a series of substances, mainly flavonoids, secreted by the plant roots that evoke the synthesis of specific messengers in the bacteria, called "nod factors". These factors once in contact with the legume root prepare the

bacteria invasora y a la planta. Esta simbiosis se ha llamado "fijación de nitrógeno atmosférico" y exige un "sistema de comunicación" muy preciso entre la planta y la bacteria. La planta secreta además de EPS, una serie de compuestos, en su mayoría flavonoides, que al llegar a la bacteria desencadenan una serie de reacciones que conducen a la síntesis de mensajeros específicos, llamados "factores de nodulación". Estos factores, al entrar en contacto con la raíz preparan la entrada de las bacterias y su conducción al nódulo, donde se establecen y ejercen su función de reducir al nitrógeno atmosférico. Las estructuras químicas de estos factores han sido aclaradas recientemente: son lípido-oligosacáridos con distintos substituyentes no glicosídicos. La biosíntesis de alguno de estos compuestos también se estudia en el laboratorio.

Es innecesario destacar la importancia que estos procesos de fijación de nitrógeno tienen para la agricultura y para la economía de nuestro país.

Las caracterización de los compuestos lipídicos sintetizados en algunos de estos sistemas bacterianos permitió aislar sustancias muy inestables, de función desconocida. En eucariotes se encontraron compuestos similares. Su estudio continúa.

entrance of the bacteria and their travel to the nodule, where they settle. The chemical structure of these factors has been studied recently and they turned out to be lipid-oligosaccharides with various substituents. Their *in vitro* biosynthesis is also studied in our laboratory.

It is not necessary to stress that this process of nitrogen fixation is of great agricultural and economical importance.

The study of lipidic intermediates formed in some of the systems mentioned above also led to the isolation of very labile compounds of similar substances were found unknown function in eucaryotic cells. This study is under way.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- P. Jansson, J. Lindberg, K.M. Swarna, W. Lasiri and M.A. Dankert: Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by *Acetobacter xylinum*. **Carb. Res.** **245** (1993) 303-510.
- 2- L. Ielpi, R.O. Couso and M.A. Dankert: Sequential Assembly and Polymerization of the Polyprenol-Linked Pentasaccharide Repeating Unit of the Xanthan Polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.** **175** (1993) 2490-2500.
- 3- I.O. Mastronardi, A. Vojnov, D.E. Bassi and M.A. Dankert: A new galacturonide from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, strain 8237. **An. Asoc. Quim. Argent.** **81** (2-3) (1993) 77-87.
- 4- C.E. Semino and M.A. Dankert: *In vitro* biosynthesis of acetan using electroporated *Acetobacter xylinum* cells as enzyme preparations. **J. Gen. Microbiol.** **139** (1993) 2745.

- 5- C.E. Semino and M.A. Dankert: Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Rhizobium leguminosarum*. **An. Asoc. Quim. Argent.** **81** (1993) 289-300.
- 6- C.E. Semino and M.A. Dankert: The *in vitro* biosynthesis of functional nodulation factors (Nod Rm) produced by *Rhizobium meliloti* 1021. **Cell. Mol. Biol.** **40** (1994) 1029-1037.

VISITAS CORTAS A LABORATORIOS / SHORT VISITS TO LABORATORIES

En el año 1993 el Dr. Marcelo A. Dankert, por invitación de la Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), visitó laboratorios de ese país con cuyos investigadores se discutió sobre temas en desarrollo de interés común. Como una consecuencia de esta visita se firmó un Convenio de Colaboración con la Escuela de Agricultura de la Universidad de Nagoya.

Se visitaron las siguientes Universidades:

- a) Laboratory of Molecular Plant Physiology, Department of Applied Biological Sciences, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya.
- b) Faculty of Science, Kanasawa University, Kanasawa.
- c) Faculty of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima.
- d) Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima.
- e) Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka.
- f) Institute of Molecular Science, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi.

In 1993, Marcelo A. Dankert was invited to Japan by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) to visit several laboratories. The different subjects being investigated, and related to polysaccharide metabolism, were discussed with the respective researchers. As a consequence of this visit an Agreement was signed with the School of Agricultural Sciences, Nagoya University.

The following Universities were visited:

- a) Laboratory of Molecular Plant Physiology, Department of Applied Biological Sciences, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya.
- b) Faculty of Science, Kanasawa University, Kanasawa.
- c) Faculty of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima.
- d) Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima.
- e) Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka.
- f) Institute of Molecular Science, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES E INTERNACIONALES / COMMUNICATIONS PRESENTED IN NATIONAL AND INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS

- XXIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), Carlos Paz, Córdoba, 17 al 20 de noviembre de 1993.
 - C.E. Semino y M.A. Dankert: Biosíntesis *in vitro* de acetano utilizando células electroporadas de *Acetobacter xylinum* como preparación enzimática.
 - A. Vojnov, M.L. Fernández Murga y M.A. Dankert: Exopolisacáridos en mutantes de *Xanthomonas campestris*.
 - D.E. Bassi y M.A. Dankert: Lípidos lábiles en medio ácido suave de *Agrobacterium radiobacter*.
 - I. Mastronardi y M.A. Dankert: Glucurónicos lipofílicos en hígado de rata.

- XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), IX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Neuroquímica (SAN) y V Reunión Anual de la Asociación Argentina de Biología del Desarrollo, Iguazú, Misiones, 26 al 29 de octubre de 1994.
 - D.E. Bassi y M.A. Dankert: Síntesis de succinoglicano en *Agrobacterium radiobacter*.
 - A. Vojnov y M.A. Dankert: Síntesis de xantano en *Xanthomonas campestris*. Estudios genéticos con la cepa 8004:Tn5 N°25.
 - M.A. Dankert: En el Simposio sobre: "Bioquímica y biología molecular de plantas", se participó con el tema: Interacción bacteria-planta en *Rhizobium meliloti*: Polisacáridos y factores de nodulación.
- V Jornadas Científicas del Hospital Interzonal General de Agudos Dr. José Penna "Dr. Juan Carlos Plunkett", Bahía Blanca.
 - Conferencia sobre: "Nuevas fronteras de la Bioquímica aplicables a la Medicina", 11 al 15 de setiembre de 1995.
- XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) Villa Giardino, Córdoba, 15 al 18 de noviembre de 1995.
 - A. Vojnov, D.E. Bassi, M. Salibe y M.A. Dankert: Síntesis y regulación del polisacárido producido por la cepa mutante 8004: Tn5 N° 25 de *Xanthomonas campestris*.
 - D.E. Bassi, A. Vojnov y M.A. Dankert: Efecto de los substituyentes no glicosídicos en la producción de succinoglicano en *Agrobacterium radiobacter*.
 - I.O. Mastroinardi, E.G. Gros y M.A. Dankert: Glicurónidos lipofílicos en bacterias.
- Swedish-Argentinian-Uruguayan Cooperation for Science and Technology (1986-1995). "Efficient use of Biological Nitrogen Fixation: Accomplishments and Prospects". Buenos Aires, Argentina, December 5-7, 1995. Organizers: Hans Ljunggren, G. Favelukes and M.A. Dankert
 - M.A. Dankert, C.E. Semino, A. Vojnov, J.C. Bossio and I. Mastronardi: Biosynthesis of Polysaccharides and related compounds in plant-associated bacteria.
 - M.A. Dankert and D.E. Bassi: Synthesis of succinoglycan in *Agrobacterium radiobacter*.
 - M.A. Dankert: Round Table: "Biodiversity: a key concept in enhancing nitrogen fixation"

**CONFERENCIAS DICTADAS EN
INSTITUCIONES DEL EXTERIOR /
LECTURES DELIVERED AT FOREIGN
INSTITUTIONS**

Marcelo A. Dankert: A series of presentations on Exopolysaccharide Biosynthesis in Bacteria, was given in the following Universities, invited by the Japan Society for the Promotion of Science (1993):

- a) Laboratory of Molecular Plant Physiology, Department of Applied Biological Sciences, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya.
- b) Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa.
- c) Faculty of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima.
- d) Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima.
- e) Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Ibaraki, Osaka.
- f) Institute of Molecular Science, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

Carlos Eduardo Semino. "Biosíntesis y estructura de exopolisacáridos complejos de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Acetobacter xylinum*" / "Biosynthesis and structure of complex exopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* and *Acetobacter xylinum*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 1994.

**JURADO DE TESIS DOCTORALES /
MEMBERSHIP OF PH.D. THESES
TRIBUNALS**

Alfredo A. Curá. "Estudio de los glucopolisacáridos $\alpha 1,4$ $\alpha 1,6$ y de las enzimas involucradas en su síntesis, en plantas de interés agronómico" / "Studies on $\alpha 1,4$ $\alpha 1,6$ glucopolysaccharides and of the enzymes involved in their synthesis, in plants of agronomic interest". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, 1995.

**JURADO DE MAESTRIAS /
MEMBERSHIP OF MASTER DEGREE
THESES TRIBUNALS**

Eduardo Antonio Pagano. Tesis para optar al título de Maestría. "Glucopolisacáridos $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ del endosperma de maíz: Utilización durante la germinación y el crecimiento de la plántula y efecto de las bajas temperaturas" / " $\alpha 1,4$ - $\alpha 1,6$ Glucopolysaccharides from maize endosperm: Metabolism during germination and plant growth and effect of low temperatures". Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. Escuela para Graduados. Argentina, 1993.

**JURADO DE TESINAS DE
LICENCIATURA / MEMBERSHIP OF
DEGREE MINI-THESES TRIBUNALS**

Lorena Raquel Lerner. Seminario de Licenciatura. "Mecanismo de acción en las enzimas ramificantes involucradas en la síntesis de glucógeno y de almidón" / "Action mechanism of the branching enzymes involved in glycogen and starch synthesis". Instituto de Investigaciones Bioquímicas «Fundación Campomar», Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina, 1995.

**ORGANIZACION DE REUNIONES
CIENTIFICAS / ORGANIZATION OF
SCIENTIFIC MEETINGS**

Swedish-Argentinian-Uruguayan Cooperation for Science and Technology (1986-1995). "Efficient use of Biological Nitrogen Fixation: Accomplishments and Prospects". Buenos Aires, Argentina, December 5-7, 1995.
Organizers: Hans Ljunggren, G. Favelukes and M.A. Dankert

**ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE
PROMOCION DE LA CIENCIA / ACTIVITIES
IN SCIENCE PROMOTION INSTITUTIONS**

El Dr. Marcelo A. Dankert actúa en los siguientes cargos:

- Miembro titular del Colegiado Directivo de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC). Desde 1980 hasta el presente

- Miembro del Comité Editorial de Ciencia e Investigación, publicación oficial de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. Desde 1992 hasta el presente.
- Secretario del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida / *International Life Sciences Institute. Argentina/ILSI, Argentina*. Desde 1992 hasta el presente.
- Vocal de la Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina. Desde 1995 hasta el presente.
- Presidente Provisorio de la Delegación de ArgenINTA, Fundación del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias (CICA), INTA, Castelar. Desde 1995 hasta el presente.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina
- SAREC
- Universidad de Buenos Aires, Argentina

Lab 206

Laboratorio de Biología Vegetal

Laboratory of Plant Biology



Personal Permanente / *Permanent Staff*

Dr. Ricardo A. Wolosiuk

Tesistas / *Ph.D. Students*

Karin Hagelin

Roberto Rodríguez Suárez

Santiago Mora García

Alejandro Heuck

Estudiantes de Pre-grado / *Undergraduate Students*

Karina Baum

Modulación de intercambio tiol-disulfato entre tiorredoxina y proteínas sustrato

El estado redox de los residuos de cisteína cumple un importante papel en la función de las proteínas. La reducción y el reordenamiento de los enlaces disulfuro y la oxidación de los grupos sulfhidrilo están catalizadas por una familia de proteínas denominada colectivamente protein disulfuro oxidoreductasas. Entre estas proteínas, las tiorredoxinas de los cloroplastos forman parte del sistema ferredoxina-tiorredoxina que funciona en la activación de las enzimas mediada por la luz. Si bien esta proteína mantiene la secuencia aminoacídica [-W-C-G-P-C-] involucrada en el intercambio tiol/disulfuro con las proteínas sustrato, las tiorredoxinas de otras fuentes (e.g., las bacterias) son mucho menos efectivas para estimular la actividad de las enzimas de los cloroplastos. Dado que la base molecular de esta afinidad es necesaria para la comprensión de los eventos fisiológicos o la aplicación a los procesos biotecnológicos, nuestro sistema de estudio es la activación reductiva de fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica por las tiorredoxinas de varias fuentes.

Mediante técnicas de ingeniería genética fueron clonados, secuenciados y expresados en bacterias ambos componentes de esta interacción. Así, el fragmento de DNA que codifica para tiorredoxina de *Escherichia coli* fue obtenido tanto ligado al marco de glutathione-S transferasa de *Schistosoma japonicum* como modificado por mutagénesis sitio-dirigida en aminoácidos específicos. La proteína de fusión originada a partir de la primera estaba formada por la tiorredoxina unida a otros polipéptidos mientras que en las últimas la molécula fue alterada en residuos aminoacídicos específicos. Por otro lado, los fragmentos de DNA que codifican para formas maduras de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de colza y trigo han sido clonados, secuenciados y expresados en bacterias. Dado que la purificación y las propiedades de la forma nativa

Modulation of thiol/disulfide exchange between thioredoxin and target proteins

The redox state of cysteine residues plays an important role in the function of proteins. The reduction as well as the reshuffling of disulfide bonds, and the oxidation of sulfhydryl groups are catalyzed by a family of proteins collectively named protein disulfide oxidoreductases. Among these proteins, chloroplast thioredoxins are constituents of the ferredoxin-thioredoxin system that functions in the light-mediated activation of chloroplast enzymes. Although this ubiquitous protein maintains the amino acid sequence [-W-C-G-P-C-] involved in thiol/disulfide exchange with target proteins, thioredoxins from other sources (e.g. bacterial) are much less effective in stimulating the activity of chloroplast enzymes. Given that molecular basis of this apparent affinity is the starting point for the comprehension of other physiological events or the application to biotechnological processes, our model system is the reductive activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by thioredoxins from several sources.

By using techniques of genetic engineering, both components of this interaction were cloned, sequenced and expressed in bacteria. Thus, the DNA fragment coding for Escherichia coli thioredoxin was either ligated in frame with the glutathione S-transferase of Schistosoma japonicum or changed in specific bases by site-directed mutagenesis. The fusion protein originated from the former was comprised of thioredoxin bound to other polypeptides whereas in the latter the thioredoxin molecule was altered in a specific amino acid residue. On the other hand, DNA fragments coding for the mature form of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase of rapeseed and wheat leaves were cloned, sequenced, and expressed in bacteria. Since neither the purification nor the properties of the native form of the rapeseed chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase were known, we also carried out the conventional purification of the enzyme starting with fresh leaves. All these proteins were first purified to apparent homogeneity and, subsequently their structural and kinetic

de la fructosa-1,6-bisfosfatasa del cloroplasto de colza no eran conocidas, también llevamos a cabo la purificación convencional de la enzima partiendo de las hojas. Todas estas proteínas fueron purificadas primero a homogeneidad aparente y luego caracterizadas sus propiedades estructurales y cinéticas.

En este contexto, analizamos en profundidad la interacción entre la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y las tioredoxinas. La forma nativa y las tioredoxinas quiméricas de *Escherichia coli* semejan a la contraparte de los cloroplastos (i.e. tioredoxina-f) cuando la activación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica se lleva a cabo en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato, Ca^{2+} y un perturbante no-fisiológico. Estos moduladores de la actividad enzimática modifican la conformación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica pero no alteran la estructura terciaria de las tioredoxinas bacterianas. Dado que la fructosa 1,6-bisfosfato, Ca^{2+} y los perturbantes no-fisiológicos modifican las interacciones no-covalentes de las proteínas pero no participan en las reacciones redox, los resultados obtenidos evidenciaron el papel que juega la conformación de las enzimas sustrato en la modulación de los intercambios tiol/disulfuro catalizados por las protein disulfuro oxidorreductasas.

properties were characterized.

In depth, we analyzed the interaction between chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and thioredoxins. Wild type and chimeric Escherichia coli thioredoxins match the chloroplast counterpart when the activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase is performed in the presence of fructose 1,6-bisphosphate, Ca^{2+} and a protein perturbant. These modulators of enzyme activity do change the conformation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase but they do not alter the tertiary structure of bacterial thioredoxins. Given that fructose 1,6-bisphosphate, Ca^{2+} , and non-physiological perturbants modify non-covalent interactions of proteins but do not participate in redox reactions, these results evinced the role played by the conformation of target enzymes in the modulation of thiol/disulfide exchanges catalyzed by protein disulfide oxidoreductases.

PUBLICACIONES/ PUBLICATIONS

A) Publicaciones originales / Original Publications

- 1- A. Heuck, M. Stein and R.A. Wolosiuk: The effect of lanthanides on the activity of fructose-1,6-bisphosphatase. **Anal. Asoc. Quim. Argentina** **81** (1993) 147-152.
- 2- R.J. Rodríguez-Suárez and R.A. Wolosiuk: Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed. **Plant Physiol.** **103** (1993) 1453-1454.
- 3- M.A. Ballícora and R.A. Wolosiuk: Enhancement of the reductive activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by modulators and protein perturbants. **Eur. J. Biochem.** **222** (1994) 467-474.
- 4- J.P. Jacquot, J. López-Jaramillo, A. Chueca, J. Cherfils, S. Lemaire, B. Chedozeau, M. Miginiac-Maslow, P. Decottignies, R.A. Wolosiuk and J. López-Gorge: High-level expression of recombinant pea chloroplast fructose-

- 1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur. J. Biochem.* **229** (1995) 675-681.
- 5- S. Mora-García, K. Hagelin and R.A. Wolosiuk: A procedure for the generation and the purification of *Escherichia coli* thioredoxins with variable N-terminal sequences. *Prot. Express. Purif.* **6** (1995) 213-219.
 - 6- R. Rodríguez-Suárez and R.A. Wolosiuk: High level expression in *Escherichia coli*, purification and properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed (*Brassica napus*) leaves. *Photosynth. Res.* **46** (1995) 313-322.
 - 7- R. Rodríguez-Suárez and R.A. Wolosiuk: Characterization of recombinant and native rapeseed chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. In **Photosynthesis: from Light to Biosphere** (Matis, P. ed.), vol. V, pp. 167-170, Kluwer Academic Publish. Dordrecht, The Netherlands, 1995.
 - 8- J.P. Jacquot, J. López-Jaramillo, A. Chueca, J. Cherfils, B. Lemaire, B. Chedozeau, M. Miginiac-Maslow, P. Decottignies, R.A. Wolosiuk and J. López-Gorge: High level expression of recombinant pea chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. In **Photosynthesis: from Light to Biosphere** (Matis, P. ed.), vol. V, pp. 75-80, Kluwer Academic Publish. Dordrecht, The Netherlands, 1995.

B) Revisiones bibliográficas / Review Articles

- 1- R.A. Wolosiuk, M.A. Ballicora and K. Hagelin: The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation. Enzyme modulation. *FASEB J.* **7** (1993) 622-637.

PRESENTACIONES POR INVITACION EN CONGRESOS CIENTIFICOS / INVITED PRESENTATIONS IN SCIENTIFIC MEETINGS

- La modulación de la actividad enzimática por la luz en las plantas superiores. IV Encuentro Latinoamericano/Iberoamericano de Fotoquímica y Fotobiología, Valparaíso, Chile. 12-15 de abril de 1994.
- Sucrose biosynthesis. First International Symposium on Sucrose Metabolism. Mar del Plata, Argentina. May 9-14, 1995.
- Concerted action of chloroplast modulators and thioredoxins in the activation of chloroplast enzymes. International conference on Thioredoxins and related proteins. Witzenhausen, University of Kassel (Germany). August 27-31, 1995.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES E INTERNACIONALES/ COMMUNICATIONS PRESENTED IN NATIONAL AND INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS

- XXIX Reunión Nacional de la SAIB, Carlos Paz, 17 al 20 de noviembre de 1993.
 - K. Hagelin y R.A. Wolosiuk: Caracterización de una proteína quimérica entre la glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum* y la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos.
 - A.P. Heuck y R.A. Wolosiuk: Desarrollo de un método sensible y rápido de medición de actividad protein-disulfuro reductasa utilizando la insulina-fluoresceintiocarbamilada.
 - R.J. Rodríguez-Suárez y R.A. Wolosiuk: Construcción de una "cDNA library" de colza. Aislamiento y

secuenciación de un clon conteniendo la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos.

- XXX Reunión Nacional de la SAIB, Iguazú, 26 al 29 de octubre de 1994.
 - K. Baum y R.A. Wolosiuk: Purificación de protein disulfuro oxidorreductasas de *Pseudomonas putida*.
 - A. Heuck y R.A. Wolosiuk: Purificación de una protein disulfuro isomerasa de semillas germinadas de colza.
 - K. Hagelin y R.A. Wolosiuk: Purificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de trigo expresada en *E. coli*.
 - R. Rodríguez Suárez y R.A. Wolosiuk: Expresión, purificación y caracterización de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de colza (recombinante).
 - S. Mora García y R.A. Wolosiuk: Mutagénesis dirigida de la tioredoxina de *E. coli*. Modificaciones en su interacción con la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de espinaca.
- XXXI Reunión Nacional de la SAIB, Villa Giardino, 15 al 18 de noviembre de 1995.
 - S. Mora García y R.A. Wolosiuk: Caracterización estructural y funcional de variantes de la tioredoxina de *E. coli* obtenidas por mutagénesis dirigida.
 - R. Rodríguez Suárez y R.A. Wolosiuk: Purificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de colza. Comparación de la enzima nativa con la obtenida en forma recombinante.
 - A. Heuck y R.A. Wolosiuk: Caracterización de una protein disulfuro isomerasa purificada de semillas germinadas de colza.
 - K. Hagelin y R.A. Wolosiuk: Caracterización cinética y estructural de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de trigo expresada en *E. coli*.
- 10th. International Photosynthesis Congress. Montpellier, France. August 20-25, 1995.
 - R. Rodriguez-Suarez y R. A. Wolosiuk: Characterization of the recombinant and native chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed (*Brassica napus*).
 - J. P. Jacquot, J. Lopez-Jaramillo, A. Chueca, J. Cherfils, B. Lemaire, B. Chedozeau, M. Miginiac-Maslow, P. Decottignies, R. A. Wolosiuk y J. Lopez-Gorge: High level expression of recombinant pea chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site.

**CURSOS DE PRE-GRADO /
PRE-GRADUATED COURSES**

Química Biológica para Biólogos. Curso de Pre-grado / *Biological Chemistry. Course for undergraduate students in Biology.* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1er. cuatrimestre 1993, 1994, 1995.

**CURSOS DE POST-GRADO /
POST-GRADUATED COURSES**

Química y Ambiente. Curso de Especialización en Ciencias Químicas / *Chemistry and Environment. Course for graduate students in Chemistry.* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1er. cuatrimestre 1994, 1995.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

Dr. en Ciencias Químicas Miguel Ballicora. "Análisis de los procesos de modulación y catálisis de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca" / *"Analysis of modulation and catalysis of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase"*. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993. Director: R.A. Wolosiuk.

TESINAS DE LICENCIATURA / DEGREE MINI -THESES

Santiago Mora García, Licenciado Cs. Biológicas, Fac.Cs.Exactas y Naturales-UBA. "Tiorredoxina de *E. coli*. Obtención en forma de proteína recombinante. Análisis de su relación con la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de espinaca" / *"Recombinant Escherichia coli thioredoxin. Studies on the interaction with spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase"*. Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993. Director: R.A. Wolosiuk.

JURADOS DE TESIS DOCTORAL / MEMBERSHIP OF PH.D. THESIS TRIBUNALS

R.A. Wolosiuk

- Pedro M. Sanllorenti (1993). "Efecto de la nutrición proteica sobre el metabolismo de las proteínas hepáticas solubles. Regulación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa" / *"Effect of protein nutrition on liver soluble proteins. Regulation of glyceraldehyde-3-P dehydrogenase"*. (Dir.: Ruben Conde) Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Cecilia Sánchez (1993). "Metabolismo de las poliaminas en tripanosomátidos" / *"Polyamine metabolism in trypanosomatids"*. (Dir.: Israel D. Algranati) Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Claudia Oliva (1993). "Cambios metabólicos en discos de papa frente a diferentes situaciones de estrés" / *"Metabolic changes in potato tuber elicited by stress"*. (Dir.: G. Daleo) Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Esteban N. Serra (1993). "Relación entre el compartimento nuclear-citoplasmático y plástidos en plantas vasculares" / *"Relationship between the nuclear-cytoplasmic compartment and plastids in vascular plants"*. (Dir.: N.J. Carrillo) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- María R. Marano (1994). "Estudio de la expresión génica en plantas superiores durante los procesos de floración y fructificación" / *"Genic expression in higher plants during flowering and fructification"*. (Dir. N.J. Carrillo) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- María F. Drincovich (1994). "Fijación fotosintética del carbono en plantas superiores: Características de las enzimas implicadas" / *"Photosynthetic carbon fixation in higher plants: Characteristics of the enzymes involved"*. (Dir. C.S. Andreo). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

- Pablo Wappner (1995). "Mecanismos moleculares de la esclerotización de la cutícula de los insectos" / "*Molecular mechanisms of sclerotization of insect cuticle*". (Dir. L. Quesada Allué). Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Universidad de Buenos Aires.
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Lab 207

Laboratorio de Interacción Microorganismos-Plantas

Laboratory of Microbe-Plant Interaction

Personal Permanente / Permanent Staff

Rodolfo A. Ugalde

Nora Iñón de Iannino

Becario Post-Doctoral / Postdoctoral Fellow

Clara Rubinstein

Tesistas / Ph.D. Students

Antonio Uttaro (hasta Febrero / until February 1995)

Silvia Altabe (hasta Abril / until April 1994)

Cristina Bertinetti

Alejandra Guerchicoff

Diego Comerci

Pablo Varela

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Gabriel Kreiman

Juan E. Ugalde (hasta Julio / until July 1995)

Visitantes / Visiting Scientists

Gabriel Briones (Comisión Nacional de Energía Atómica /
National Atomic Energy Commission).

1- Bioquímica y biología molecular de la interacción entre plantas-microorganismos y metabolismo de carbohidratos en bacterias

En el laboratorio se estudia la biología molecular y la biosíntesis de distintos exopolisacáridos, polisacáridos de reserva (glucógeno), oligosacáridos de N-Acetyl-D-glucosamina y glucanos cíclicos en bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Los glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ se sintetizan utilizando UDPglucosa como sustrato dador, a través de un mecanismo original descubierto en el laboratorio en el que la propia enzima, la UDPglucosa- $\beta(1-2)$ -glucano-transferasa, actúa como intermediario proteico. En *Agrobacterium tumefaciens* la UDPglucosa- $\beta(1-2)$ -glucano-transferasa está codificada en una región cromosómica denominada *chvB* (*chromosomal virulence B*). Mutaciones en esta región afectan la síntesis del glucano cíclico y como consecuencia la virulencia. Contiguo al locus *chvB* está localizado el locus *chvA* (del Inglés *chromosomal virulence A*) que codifica para una proteína de la membrana interna de 70 kDa necesaria para secretar el glucano cíclico al espacio periplásmico. Estos resultados sugieren que el glucano cíclico es en *Agrobacterium* una señal necesaria para la patogenicidad. En *Rhizobium meliloti* existen dos regiones cromosómicas equivalentes e intercambiables con las de *Agrobacterium* denominadas *ndvB* y *ndvA*, mutantes en estos genes afectan también la síntesis y la secreción del $\beta(1-2)$ -glucano respectivamente, así como la capacidad de la bacteria para invadir el nódulo. Estos resultados sugieren que como en *Agrobacterium* el glucano cíclico $\beta(1-2)$ es necesario para una efectiva interacción con su huésped.

Bacterias de la familia *Rhizobiaceae* de crecimiento lento como *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium loti* no sintetizan glucanos cíclicos $\beta(1-2)$, en cambio producen y secretan a su periplasma glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ con un grado de polimerización aproximado de 10 a 11 glucosas. La síntesis de estos glucanos procede con la participación de una proteína

1- Biochemistry and molecular biology of the interaction between plant-microorganisms and bacterial carbohydrate metabolism

In the laboratory we study the molecular biology and the biosynthesis of exopolysaccharides, reserve polysaccharides (glycogen), N-Acetyl-D-glucosamine oligosaccharides and cyclic glucans in *Rhizobiaceae*. Cyclic $\beta(1-2)$ glucans are synthesized using UDPglucose as sugar donor by a novel mechanism discovered in the laboratory, in which the enzyme UDPglucose- $\beta(1-2)$ -glucan-transferase functions as a protein intermediate. In *Agrobacterium tumefaciens* the UDPglucose- $\beta(1-2)$ -glucan-transferase is coded by a chromosomal region called *chvB*, chromosomal virulence region B. Mutations in this region affect virulence and synthesis of cyclic $\beta(1-2)$ glucans. Contiguous to *chvB* locus is the locus *chvA*, chromosomal virulence region A, that codes for a 70 kDa membrane protein required for secretion of cyclic $\beta(1-2)$ glucan into the periplasmic space. These results suggested that in *Agrobacterium* cyclic $\beta(1-2)$ glucan is a signal required for plant pathogenesis. In *Rhizobium meliloti* two regions equivalent and interchangeable with *chvB* and *chvA*, named *ndvB* and *ndvA*, were described, mutations in these regions affect the synthesis and secretion of cyclic $\beta(1-2)$ glucan respectively, as well as the ability to invade the nodule. These results suggest that in *Rhizobium* as in *Agrobacterium* the synthesis and secretion of cyclic $\beta(1-2)$ glucan is required for effective plant host interaction. Slow growing *Rhizobiaceae* like *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium loti* do not form cyclic $\beta(1-2)$ glucan, however cyclic $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ glucans with a degree of polymerization between 10 to 11 are synthesized and secreted into the periplasmic space. The synthesis of these glucans proceeds through a 90 kDa intermediate protein, thus suggesting a general mechanism through intermediate proteins for the synthesis of these cyclic glucans.

Our laboratory studies the biosynthesis of nod-factors, lipo-oligosaccharides secreted by *Rhizobium*. The saccharide

intermediaria de 90 kDa, lo que sugiere un mecanismo general con la participación de proteínas intermediarias para la biosíntesis de estos glucanos cíclicos.

Nuestro grupo estudia también la biosíntesis de los denominados *nod-factors*, lipo-oligosacáridos secretados por *Rhizobium* cuya porción sacarídica está formada por un oligosacárido $\beta(1-4)$ N-Acetil-D-Glucosamina. Estudios *in vitro* con sistemas libres de células establecieron que el oligosacárido se elonga por el agregado a partir de UDP-N-Acetyl-D-Glucosamina de residuos de N-Acetyl-D-Glucosamina al extremo no reductor de la molécula nascente. La enzima responsable de la biosíntesis es una quitina-sintetasa que adiciona secuencialmente N-Acetyl-D-Glucosamina a un aceptor o primer aún no identificado, estando el número de residuos agregados controlado por la concentración de UDP-N-Acetyl-D-Glucosamina.

Se estudia en *Rhizobiaceae* la organización genómica y la regulación de los genes que participan en la biosíntesis de glucógeno (Glg). En *A. tumefaciens* estos genes se transcriben en el mismo sentido y en el siguiente orden: Fosforilasa; Enzima Ramificante; ADPglucosa pirofosforilasa; Glucógeno Sintetasa formando un solo operon, en el extremo 3' de este operon se encuentra el gen *ExoC* que codifica para la fosfoglucomutasa (pgm), necesaria para la síntesis de UDPGlucosa, mutantes en este gen son deficientes en la síntesis de exopolisacárido y glucanos.

En *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo patógeno que produce severas pérdidas en girasol, se identificó un polisacárido de la pared del micelio que induce una serie de respuestas en células de zanahoria. Utilizando la técnica de DD-RT-PCR (del Inglés differential display-reverse transcriptase-polymerase chain reaction) se identificó un gen que codifica para una glicoproteína extracelular de 48 kDa que es inducido 5 a 10 veces en presencia del extracto de la pared del hongo.

moiety of nod-factor is a $\beta(1-4)$ N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide. In vitro studies with cell free extracts showed that the oligosaccharide is elongated by the sequential addition of N-Acetyl-D-glucosamine from UDP-N-Acetyl-D-glucosamine to the non reducing end of the growing molecule. The enzyme is a chitin-synthetase that initiates the synthesis by the addition of N-Acetyl-D-glucosamine to a primer not yet identified, the number of sugar residues added is controlled by the concentration of UDP-N-Acetyl-D-glucosamine.

The genomic organization and regulation of Rhizobiaceae glycogen genes (Glg) is studied. In *A. tumefaciens* Glg genes are transcribed in the same direction in the following order: Phosphorylase; Branching enzyme; ADPglucose pyrophosphorylase; glycogen synthetase. All these genes form a single operon and at the 3' end maps the *exoC* gene that codes for the phosphoglucomutase (pgm), which is required for the synthesis of UDPglucose, *exoC* mutants do not form exopolysaccharide and glucans.

Sclerotinia sclerotiorum is a pathogenic fungus that causes severe losses in important crops. A polysaccharide from the mycelium cell wall was identified as inducer of a series of responses in carrot cell cultures. Using differential display reverse transcribed PCR (DD-RT-PCR) a gene that codes for a 48 kDa extracellular glycoprotein was observed to be stimulated 5- to 10- fold in the presence of the cell wall polysaccharide.

2- Genetic manipulation of microorganisms for their application to the biological control of insects

Microbial pesticides have been widely used for many years all over the world to control insect pests of agronomic and sanitary importance. Recent developments in the genetics and molecular biology of the genes responsible for the insect toxic effect made possible the manipulation and the construction at the laboratory of recombinant organisms expressing the toxins and the construction of wide host range recombinant *B. thuringiensis*.

2- Manipulación genética de microorganismos para su aplicación al control biológico de insectos

Pesticidas microbiológicos han sido utilizados durante muchos años en todo el mundo para el control de insectos de importancia sanitaria en la agricultura. Recientes desarrollos de la genética y la biología molecular de los genes de proteínas entomopatógenas han hecho posible su manipulación y construcción en el laboratorio de organismos recombinantes que expresan entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Entre las bacterias insecticidas, *Bacillus thuringiensis* (un bacilo esporurante que forma cristales larvicidas) es la más utilizada y representa el 75% del mercado de insecticidas biológicos. El clonado del gen cry IVB de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* en el plásmido pAF1 integrativo en *B. subtilis* permitió la construcción de la cepa recombinante *B. subtilis* 168. Se trabaja en la construcción de cepas recombinantes de *Rhizobium* expresando toxinas cry bajo el control de promotores nod o fix. Se ha iniciado el subclonado de genes cry en plásmidos estables en *Rhizobium*. Estas cepas recombinantes se están estudiando como posibles alternativas para el control biológico de insectos que atacan las raíces de leguminosas.

3- Biotecnología (conjuntamente con el laboratorio del Dr Alberto Carlos C. Frasch)

Se trabaja en la manipulación genética de la cepa vacunal de *Brucella abortus* S19 a los efectos de introducir en la misma vectores apropiados que permitan la integración en forma estable en su cromosoma de genes de proteínas heterólogas de importancia veterinaria. Se trabaja en la construcción de una cepa que exprese el antígeno vacunal VP1 del virus de la fiebre aftosa. Se espera obtener inmunógenos potenciados ya que la cepa vacunal de *B. abortus* S19 se multiplica en el interior del macrófago generando una inmunidad muy duradera, se ha descrito también la capacidad inmunoestimulante del LPS de *Brucella* spp.

Among bacterial insecticides, *Bacillus thuringiensis* (a spore forming bacillus that forms larvicidal crystals) is the more widely used and accounts for 75% of the bioinsecticide market. Cloning of cry IVB gene from *B. thuringiensis* var *israelensis* in plasmid pAF1 (integrative in *B. subtilis*) was achieved and the construction of recombinant *B. subtilis* strain 168 expressing the toxin is being conducted. The construction of recombinant *Rhizobium* spp. expressing cry toxins under the control of nod and fix promoters was initiated by subcloning cry genes in plasmids stable in *Rhizobium* strains. These recombinant rhizobia will be tested for the control of insects that attack plant roots.

3- Biotechnology (joint direction with Dr Alberto C. C. Frasch)

Genetic manipulation of the *Brucella abortus* S19 vaccinal attenuated strain in order to stably integrate into the chromosome foreign genes of veterinary applicability is being carried out. Currently we are working in the construction of a recombinant strain expressing the foot and mouth VP1 protective antigen. We expect to obtain improved immunogens since *Brucella abortus* S19 multiply inside the macrophage cells inducing a long lasting immunity and the good immunostimulating effect of *Brucella* spp LPS. This type of live attenuated vaccines expressing antigens from pathogenic organisms of dangerous or difficult manipulation, will be in the future the alternative of election.

Este tipo de vacunas vivas atenuadas expresando antígenos de organismos patógenos de difícil o peligrosa manipulación, serán en el futuro una alternativa de elección.

PUBLICACIONES / RECENT PUBLICATIONS

- 1- N. Iñón de Iannino and R.A. Ugalde: Biosynthesis of β (1-3), β (1-6) glucan in *Bradyrhizobium* spp. **Arch. Microbiol.** **159** (1993) 30-38.
- 2- P. Varela, M. Rivas, M. Binsztein, P. Cremona, P. Herrmann, O. Burrone, R.A. Ugalde and A.C.C. Frasch: Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from Argentine outbreak by PCR for ctxA1 and ctxA2-B. **FEBS Lett.** **315** (1993) 74-76.
- 3- A. Uttaro, L. Ielpi and R.A. Ugalde: Galactose metabolism in *Rhizobiaceae*. Characterization of exoB mutants. **J. Gen. Microbiol.** **139** (1993) 1055-1062.
- 4- P. Varela, G. Polievick, M. Rivas, I. Chinen, N. Binsztein, A.C.C. Frasch and R.A. Ugalde: Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. **J. Clinical Microbiol.** **32** (1994) 1246-1248.
- 5- A. Uttaro and R.A. Ugalde: A chromosomal cluster of genes encoding ADP-glucose synthetase, glycogen synthase and phosphoglucomutase in *Agrobacterium tumefaciens*. **Gene** **150** (1994) 117-122.
- 6- S. Altabe, N. Iñón de Iannino, D. De Mendoza and R.A. Ugalde: New osmoregulated β (1-3), β (1-6) glucosyl-transferase(s) in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** **176** (1994) 4890-4898.
- 7- N. Iñón de Iannino, S.G. Pueppke and R.A. Ugalde: Biosynthesis of the Nod factor chito-oligosaccharide backbone in *Rhizobium fredii* is controlled by the concentration of UDP-N-Acetyl-D-glucosamine. **Molec. Plant Microbe Interac.** **8** (1995) 292-301.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- 1- Dr. Antonio Uttaro. "Bioquímica y biología molecular del metabolismo de hidratos de carbono y de la síntesis de exopolisacáridos en *Rhizobiaceae*" / "Biochemistry and molecular biology of carbohydrate metabolism and exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobiaceae*". Doctor de la Universidad de Buenos Aires, orientación en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.
- 2- Dr. Silvia Altabe. "Estudios bioquímicos y genéticos de la interacción *Azospirillum*-planta" / "Biochemical and genetic studies on the interaction Plant-Azospirillum". Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Rosario, 1994.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Universidad de Buenos Aires, 1993-1995.
- CONICET, 1993-1994.
- Comisión de Investigaciones de la Pcia. de Buenos Aires **CIC**, 1994-1995.
- Ministerio de Cultura y Educación, 1994-1995.
- Centro Azucarero Regional del Norte Argentino **CARNA**, 1995.

Lab 208

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas

Laboratory of Plant Molecular Biology

Personal Permanente / Permanent Staff

Roberto J. Staneloni

Personal Técnico Profesional / Technical Staff

Gabriela Rosetti

Tesistas / Ph.D. Students

Sandra V. Fernández (1990-1995)

Pablo Cerdán (desde / since 1993)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Ariel Scharlat

Gustavo Gudesblat

Estudio de la regulación de la expresión de genes nucleares de plantas por la luz

La luz es uno de los factores más importantes en el desarrollo de las plantas. Ellas poseen sistemas que les permiten sensor tanto la calidad como la intensidad de la luz. Entre las respuestas de las plantas reguladas por la luz se encuentra la germinación, el crecimiento de los tallos, el desarrollo de las hojas, raíces, cloroplastos y la inducción de la floración.

Los procesos regulados por la luz son mediados por los siguientes fotoreceptores: los fitocromos, los receptores azul/ultravioleta UV-A y los receptores UV-B. La respuesta de las plantas a una señal luminosa depende de la calidad de ésta y del estado de las plantas. Los fotoreceptores activados por la luz transmiten su señal a través de un complejo sistema de interacciones conocida con el nombre de proceso de transducción de la señal de la luz.

Nosotros estamos interesados en el estudio de la regulación de la expresión de los genes nucleares por los fotoreceptores de las plantas. Con la idea de llevar a cabo este estudio hemos aislado y caracterizado varios genes Cab (chlorophyll a/b binding proteins) de plantas de tabaco y papa. La expresión de estos genes nucleares es regulada por la luz. Para identificar los elementos regulatorios del promotor Cab hemos preparado un grupo de delecciones 5' del promotor Cab. Luego el promotor Cab entero como así también varios fragmentos de promotores Cab delecionados fueron fusionados transcripcionalmente a la región de código del gen gusA (GUS) y transferidos via *Agrobacterium tumefaciens* a plantas de tabaco y *Arabidopsis thaliana*.

Se han obtenido diversas plantas transgénicas que contienen la construcción promotor Cab-GUS. Estas plantas contienen diferentes delecciones secuenciales del promotor Cab fusionadas al gen gusA. Las plantas transgénicas fueron sometidas a diferentes tratamientos de luz y la actividad GUS fue considerada como una

Study of the regulation of the expression of plant nuclear genes by light

Light is one of the most important factors for plant development. Plants contain systems able to sense both the quantity and quality of light. Among the light-regulated responses it might be found: germination, steam growth, leaves, roots and chloroplasts development and the induction of the flower.

The light-regulated processes are mediated by the following photoreceptors: phytochromes, the blue/violet UV-A and the UV-B photoreceptors. The responsiveness of plants to light depends on the quality of light and its developmental state. The light-activated photoreceptors transmit its signal through a complex system of interaction known as the light signal transduction pathway.

We are interested in the study of the regulation of the expression of nuclear genes by plant photoreceptors. To carry out this study we isolated and characterized several Cab (chlorophyll a/b binding proteins) genes of tobacco and potato plants. The expression of these nuclear genes was light-regulated. To be able to identify light regulatory elements in the Cab promoter we had to prepare a set of several consecutive 5' deletions of this promoter. Then both the full-length Cab promoter and a number of 5' deleted Cab promoter were transcriptionally fused to the gusA coding region (GUS) and transferred to the tobacco and *Arabidopsis thaliana* plants via *Agrobacterium tumefaciens*.

Several transgenic plants containing the Cab promoter-GUS construct have been obtained. These plants had different deletions of the Cab promoter fused to a gusA gene. They were treated under different conditions of light and the GUS activity was considered as a measure of the Cab gene expression. These plants have been used for the characterization of the Cab promoter nucleotide sequences that are important to determine the responses to light. We have recently found that a 146 bp fragment of the tobacco Cab promoter confers photoregulated GUS activity

medida de la expresión del gen Cab. Estas plantas fueron usadas para caracterizar las secuencias de nucleótidos del promotor Cab que son importantes para determinar las respuestas a la luz. Recientemente hemos caracterizado un fragmento de 146 bp del promotor Cab de tabaco que confiere respuestas fotorreguladas de expresión GUS a un promotor mínimo truncado del gen 35 S del virus del mosaico de coliflor. Esta es la primera etapa en la caracterización de secuencias del promotor Cab que actúan en cis. Estas secuencias serán de gran utilidad como marcadores moleculares en el estudio de los procesos regulados por la luz. De esta manera se podrá analizar en detalle la transducción de la señal durante diferentes formas de activación de los fotoreceptores por tratamientos de luz. Además tendremos una buena herramienta para estudiar los factores proteicos que interactúan en las respuestas transcripcionales reguladas por la luz.

expression to a truncated minimal cauliflower mosaic virus 35S promoter. This is the first step in the precise characterization of the cis-acting sequences of the Cab promoter. These sequences might be useful in the study of the light-regulated processes as molecular markers. In this way it will be possible to study in detail the signal transduction during the photoreceptor activation by different light treatments. We might count with appropriate tools to study besides the protein factors interacting in the light-regulated transcriptional activation.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1- R.J. Staneloni, P.D. Cerdán, M. Redal and L.J. Szabo: Comparative studies of *Sclerotinia sclerotium* based on analysis of ribosomal DNA. **Anales Asoc. Quím. Argent.** **81** (1993) 197-204.
- 2- S.V. Fernández, P.D. Cerdán and R.J. Staneloni: Isolation and characterization of a cluster containing six Lhcb1 genes from potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Physiology** **108** (1995) 1342.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES / COMMUNICATIONS PRESENTED IN NATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS

- XXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, noviembre de 1993.
 - P.D. Cerdán, S.V. Fernández, J.J. Casal, R.A. Sánchez y R.J. Staneloni: El fitocromo y sus efectos en la regulación de los genes nucleares en plantas de tabaco.
 - S.V. Fernández, P.D. Cerdán y R.J. Staneloni: Estudio de la expresión específica de tejido de los genes Cab de papas.
- XXXI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, M. 179, Villa Giardino, Córdoba, Argentina, noviembre de 1995.
 - P.D. Cerdán, A.G. Scharlat, J.J. Casal, R.A. Sánchez y R.J. Staneloni: Análisis de las secuencias regulatorias del promotor Cab B de tabaco.
 - G.E. Gudesblat, G. Rosetti, P.D. Cerdán y R.J. Staneloni: Transformación genética de distintos ecotipos de

Arabidopsis thaliana.

- A.G. Scharlat, P.D. Cerdán, J.J. Casal y R.J. Staneloni: Activación de la transcripción de genes nucleares en plantas superiores por la luz azul.

TESIS DE LICENCIATURA / DEGREE MINI-THESES

- Licenciado en Ciencias Biológicas Pablo Diego Cerdán. "Estudios sobre regulación de genes de plantas" / "*Studies on plant gene regulation*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.
- Licenciado en Ciencias Biológicas Gustavo Gudesblat. "Transformación genética de *Arabidopsis thaliana*" / "*Genetic transformation of Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- Doctor en Ciencias Biológicas Sandra V. Fernández. "Estudio de la estructura y regulación de la expresión de genes Cab en plantas" / "*Study of the structure and regulation of the expression of plant Cab genes*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

CURSOS DE POST-GRADO/ POST-GRADUATE COURSES

- "Biología Molecular Vegetal y Transformación de plantas" / "*Molecular Biology of Vegetals and Plant transformation*". 15 de mayo-29 de mayo de 1995 / May 15th-May 29th, 1995. Directores del Curso: J. Tandecarz, R.J. Staneloni / Course directors: J. Tandecarz, R.J. Staneloni. Otros profesores / Other professors: Dres. E. Rech (CENARGEN, EMBRAPA, Brazilia, Brasil), A.C. Miranda Brasileiro (CENARGEN, EMBRAPA, Brazilia, Brasil), J.J. Casal (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), R.A. Wolosiuk.

SUBSIDIOS / GRANTS

- Universidad de Buenos Aires.

Lab 209

Laboratorio de Glicobiología

Laboratory of Glycobiology



Personal Permanente / Permanent Staff

Armando J. Parodi

Becarios Post-Doctorales / Post-Doctoral Fellows

Marcia T. Xavier (Abril de 1993 a Marzo de 1995 / April 1993 up to March 1995)

Sergio Trombetta (hasta Marzo / until March 1995)

Olga Castro (Marzo de 1995 a Diciembre de 1995 / March 1995 up to December 1995)

Tesistas / Ph. D. Students

Marcelo Sousa (hasta Julio / until July 1995)

Fabiana Fernández (hasta Diciembre / until December 1995)

Silvana Merello (hasta Junio / until June 1995)

Vivian Alvarez (hasta Diciembre / until December 1994)

Verónica Pascuccelli (desde Junio / since June 1993)

Sandra Fanchiotti (desde Marzo / since March 1994)

Carlos Labriola (desde Junio / since June 1995)

Estudiantes de Pre-grado/ Undergraduate Students

Sandra Metzner (Abril de 1994 a Marzo de 1995 / April 1994 up to March 1995)

Juan Ugalde (desde Octubre / since October 1995)

Una glucosiltransferasa del retículo endoplásmico involucrada en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas

La N-glicosilación de proteínas se inicia por la transferencia, en el lumen del retículo endoplásmico (ER), de un oligosacárido ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) de un derivado de dolicol-P-P a un residuo de asparagina en cadenas polipeptídicas nacientes. El procesamiento de los oligosacáridos se inicia inmediatamente luego de la reacción de transferencia: los residuos de glucosa son removidos por dos glucosidasas específicas localizadas en el lumen del ER. La glucosidasa I remueve la unidad de glucosa más externa (unida por unión $\alpha 1-2$) mientras que la glucosidasa II remueve las dos unidades de glucosa restantes (unidas por unión $\alpha 1-3$). Algunos residuos de manosa pueden ser también removidos por manosidasas específicas. Las glicoproteínas son entonces transportadas al aparato de Golgi donde pueden ocurrir otras reacciones de procesamiento de oligosacáridos.

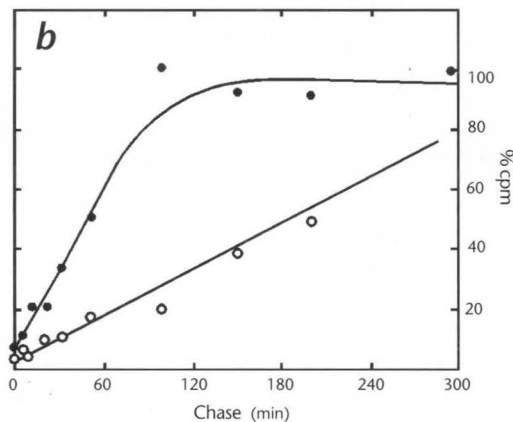
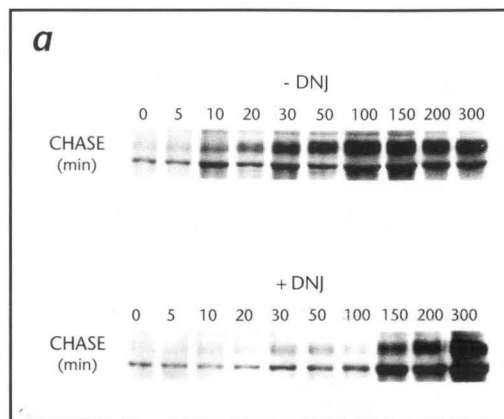
Hemos encontrado en nuestro laboratorio que los oligosacáridos unidos a proteína, ya libres de residuos de glucosa por la acción de las glucosidasas I y II ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) son transitoriamente re-glucosilados en el ER. Los compuestos formados fueron identificados como $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. *In vivo* estos compuestos son inmediatamente de-glucosilados. La glucosiltransferasa responsable de la re-glucosilación (UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, GT) fue detectada en células de mamíferos, plantas, hongos y protozoos y fue purificada a homogeneidad de hígado de rata y de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Se encontró que es una proteína soluble del lumen del ER de peso molecular, en condiciones no nativas, de alrededor de 150.000, que usa UDP-Glc como dador de glucosa y que requiere Ca^{2+} para su actividad. La enzima responsable de la de-glucosilación de los compuestos

An endoplasmic reticulum glucosyltransferase involved in the quality control of glycoprotein folding

N-glycosylation of proteins is initiated by the transfer, in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), of an oligosaccharide ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) from a dolichol-P-P derivative to asparagine residues in nascent polypeptide chains. Processing of the protein-linked oligosaccharides is initiated immediately after the transfer reaction: the glucose residues are removed by two highly specific glucosidases located in the lumen of the ER: glucosidase I removes the more external $\alpha (1-2)$ -linked glucose residue whereas glucosidase II excises both $\alpha (1-3)$ -linked glucose units. Some mannose units may also be removed in the same subcellular location by specific mannosidases. Glycoproteins are then transported to the Golgi apparatus where further processing of the oligosaccharides may occur.

It was found in our laboratory that protein-linked oligosaccharides already freed from glucose units due to the action of glucosidases I and II ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) were transiently re-glucosylated in the ER. The compounds formed were identified as protein-linked $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. *In vivo* these compounds were immediately de-glucosylated by the above mentioned glucosidase II. The glucosyltransferase responsible for the re-glucosylation (UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, GT) was detected in mammalian, plant, fungal and protozoan cells and was purified to apparent homogeneity from rat liver and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. It was found to be a soluble protein of the ER, to use UDP-Glc as sugar donor, to have a molecular weight under denaturing conditions of about 150,000 and to require Ca^{2+} for activity.

The most striking feature of the GT is that it glucosylates, in cell free assays, denatured but not native glycoproteins. It was observed that denatured endo- β -N-acetylglucosaminidase H-(Endo H)-de-glycosylated



Efecto de la retención de residuos de glucosa en el arribo de Cruzipaina a los lisosomas. Tomado de: Labriola, C. et al., *J Cell Biol.* **130**, 771-779 (1995).

re-glucosilados por la GT es la ya mencionada glucosidasa II.

La propiedad más importante de la GT es que en sistemas libres de células glucosila glicoproteínas mal plegadas (desnaturalizadas) pero no glicoproteínas correctamente plegadas (nativas). Se observó que glicoproteínas desnaturalizadas (mal plegadas) y deglicosiladas con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) son inhibidores potentes de la glucosilación de glicoproteínas desnaturalizadas mientras que la albúmina nativa de suero bovino no tiene efecto. La Endo H corta entre los dos residuos internos de N-acetilglucosamina liberando los oligosacáridos y dejando unido a la proteína un único residuo de N-acetilglucosamina. Se concluyó que la interacción de la GT con dominios proteicos expuestos en conformaciones desnaturalizadas pero no en las nativas era requerida para la reacción de transferencia. Posteriormente encontramos que la GT en realidad reconoce dos elementos en las conformaciones desnaturalizadas, los dominios proteicos mencionados más arriba, formados por amino ácidos hidrofóbicos alifáticos o aromáticos y la totalidad de los oligosacáridos aceptores. Con referencia a estos últimos elementos, hemos encontrado que la GT puede discriminar entre $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y que también reconoce la unidad más interna de N-acetilglucosamina. En muchas glicoproteínas nativas esta unidad no es accesible a una sonda macromolecular como la Endo H. En esos casos, para permitir la liberación del oligosacárido por esta glicosidasa, es necesario desnaturalizar previamente a la glicoproteína. Se puede especular, por lo tanto, que un plegamiento correcto de la mayoría de las glicoproteínas ocultaría el residuo de N-acetilglucosamina interna a la GT y así impediría la glucosilación. Por otra parte se encontró que ambos elementos de reconocimiento, los dominios proteicos de amino ácidos hidrofóbicos expuestos en conformaciones desnaturalizadas y el residuo de N-

glicoproteínas were potent inhibitors of the glucosylation of the glycosylated species whereas native bovine serum albumin had no effect (Endo H breaks the bond between the internal N-acetylglucosamine residues of the oligosaccharide, leaving one of the residues linked to the protein moiety). It was concluded that interaction of the glucosyltransferase with protein domains exposed in denatured but not in native conformations was required for the transfer reaction. Further work showed that the enzyme actually recognized two elements in denatured conformations, the above mentioned protein domains composed of hydrophobic aromatic or aliphatic amino acids and the entire oligosaccharide acceptors. Concerning the latter elements, it was shown that the enzyme was able to discriminate between $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ and that it also recognized the innermost N-acetylglucosamine unit. In many native glycoproteins the innermost N-acetylglucosamine is not accessible to a macromolecular probe as Endo H. In those cases, cleavage of oligosaccharides by the endoglycosidase requires denaturation of the glycoprotein. It may be speculated that proper folding of most glycoproteins would hinder recognition of the innermost N-acetylglucosamine unit by the GT and thus prevent glucosylation. On the other hand, both recognition elements, the N-acetylglucosamine and the hydrophobic patches exposed in denatured but not in native conformations, had to be covalently linked. On finely modulating the secondary and tertiary structure of glycoproteins by known procedures it was found that the GT is an extremely sensitive sensor of tertiary structures of glycoproteins and that the glucose acceptor capacity of glycoproteins is directly proportional to their structural disorder.

Proteins adopt their tertiary and in many cases their quaternary structures in the ER, before being transported to the cis cisternae of the Golgi apparatus. Only properly folded proteins are transported to the Golgi apparatus whereas misfolded species are degraded within the ER. A very stringent quality control is therefore required to

acetilglucosamina deben estar unidos covalentemente. Mediante una modulación fina de las estructuras secundaria y terciaria de glicoproteínas por procedimientos conocidos se encontró que la GT es un sensor extremadamente sensible de las estructuras terciarias de las glicoproteínas y que la capacidad aceptora de glucosas de éstas es directamente proporcional a su desorden estructural.

Las proteínas del camino de secreción adoptan su estructura terciaria y en muchos casos también cuaternaria en el ER, antes de ser transportados a las cisternas cis del aparato de Golgi. Solamente las proteínas plegadas correctamente son transportadas al aparato de Golgi mientras que las mal plegadas son degradadas en el ER. La existencia de un control de calidad del plegamiento de proteínas muy estricto es por lo tanto necesaria para impedir el pasaje de proteínas mal plegadas a las cisternas del aparato de Golgi. Un modelo para dicho control de calidad aplicable a glicoproteínas ha sido propuesto recientemente. De acuerdo a este modelo, los oligosacáridos existen en el ER en dos estados interconvertibles, monoglucosilados y de-glucosilados. Su formación está catalizada, respectivamente, por la GT y la glucosidasa II. La calnexina, una proteína (chaperona) unida a la membrana del ER que tiene propiedades de lectina ya que reconoce a oligosacáridos monoglucosilados, uniría las estructuras con una glucosa y así retendría a las glicoproteínas en el ER hasta tanto ellas adopten un plegamiento correcto. Al adoptar dicho plegamiento, las glicoproteínas serían sustrato para la glucosidasa II pero no para la GT y serían así liberadas del ancla de la calnexina. Las glicoproteínas serían así capaces de ser transportadas al aparato de Golgi. De acuerdo con el modelo propuesto, se ha encontrado que la adición de desoxinojirimicina a células de *Trypanosoma cruzi* demora la salida de moléculas correctamente plegadas de una glicoproteína lisosomal (la cruzipaina) del ER. La desoxinojirimicina es un inhibidor de la glucosidasa II y su efecto en *T.*

prevent passage of misfolded proteins to the Golgi cisternae. A model for such quality control applicable to glycoproteins has been recently proposed. According to it, the oligosaccharides in the endoplasmic reticulum shuttle between monoglucosylated and unglucosylated structures, their formation being catalyzed by the GT and glucosidase II. A membrane bound protein (chaperone), calnexin, that has a lectin-like activity that recognizes the monoglucosylated oligosaccharides, would bind the monoglucosylated structures, and thus retain glycoproteins in the ER as long as the protein moieties are not properly folded. On attaining the correct native conformations, glycoproteins would become substrates for the glucosidase but not for the GT and thus be liberated from the calnexin anchor. Glycoproteins would then be able to be transported to the Golgi apparatus. According to the proposed model it was observed that addition of deoxynojirimycin, a glucosidase II inhibitor, to Trypanosoma cruzi cells delayed exit of a lysosomal glycoprotein (cruzipain) from the ER. The drug specifically blocks, in those cells, removal of the glucose units added by the GT.

cruzi es el de específicamente bloquear la remoción de las unidades de glucosa adicionadas por la GT.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- A) Publicaciones originales / Original publications

- 1- M.A. Ferrero-García, S.E. Trombetta, D.O. Sánchez, A. Reglero, A.C.C. Frasch and A.J. Parodi: The Action of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on Glycolipids and Glycoproteins. **Eur. J. Biochem.** **213** (1993) 765-771.
- 2- M.A. Ferrero-García, D.O. Sánchez, A.C.C. Frasch and A.J. Parodi: The Effect of Pyridoxal 5'-phosphate and Related Compounds on *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase. **Anales Asoc. Quím. Argentina** **81** (1993) 127-132.
- 3- O.E. Campetella, A.D. Uttaro, A.J. Parodi and A.C.C. Frasch: A Recombinant *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase Lacking the Amino Acid Repeats Retains the Enzymatic Activity. **Mol. Biochem. Parasitol.** **64** (1994) 337-340.
- 4- M.T. Xavier, S. Merello and A.J. Parodi: The Presence in *Trypanosoma cruzi* Microsomes of $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ and $\alpha(1,6)$ Mannosidase Activities not Involved in Protein-linked Man α 9GlcNAc $_2$ Processing. **Cell. Mol. Biol.** **40** (1994) 989-997.
- 5- S. Merello, M.T. Xavier and A.J. Parodi: Novel (Rhamnosyl and Ribosyl) and Uncommon (Xylosyl) Monosaccharide Residues are Present in Asparagine-linked Oligosaccharides of the Trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. **J. Biol. Chem.** **269** (1994) 20294-20298.
- 6- M. Engstler, M.A. Ferrero-García, A.J. Parodi, R. Schauer, T. Storz-Eckerlin, A. Vasella, Ch. Witzig and X. Zhu: N-(4-Nitrophenyl)oxamic Acid and Related N-acylanilines are Non-competitive Inhibitors of *Vibrio cholerae* Sialidase but Do Not Inhibit *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei* Trans-sialidases. **Helvetica Chim. Acta** **77** (1994) 1166-1174.
- 7- F. Fernández, S. Trombetta, U. Hellman and A.J. Parodi: Purification to Homogeneity of UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and Apparent Absence of the Enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** **269** (1994) 30701-30706.
- 8- S. Merello, M.T. Xavier and A.J. Parodi: The Presence of Galactofuranose and Ribose Units in Asparagine-linked Oligosaccharides of the Digenetic Trypanosomatid *Endotrypanum schaudinni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **69** (1995) 73-79.
- 9- A.J. Parodi, C. Labriola and J.J. Cazzulo: The Presence of Complex-type Oligosaccharides at the C-terminal Domain Glycosylation Site of Some Molecules of Cruzipain. **Mol. Biochem. Parasitol.** **69** (1995) 247-255.
- 10- S. Merello, A.J. Parodi and R.O. Couso: Characterization and Partial Purification of a Novel Enzymatic Activity: UDP-GlcNAc:Ser-protein N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase from the Cellular Slime Mold *Dictyostelium*

discoideum. **J. Biol. Chem.** **270** (1995) 7281-7287.

- 11- J.O. Previato, C. Jones, M.T. Xavier, R. Wait, L.R. Travassos, A.J. Parodi and L. Mendonça-Previato: Structural Characterization of the Major Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchored Glycoprotein from Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **J. Biol. Chem.** **270** (1995) 7241-7250.
- 12- V. Alvarez, A.J. Parodi and R. Couso: Characterization of the Mannose 6-Phosphate-Dependent Pathway of Lysosomal Enzyme Routing in an Invertebrate. **Biochem. J.** **310** (1995) 589-595.
- 13- C. Labriola, J.J. Cazzulo and A.J. Parodi: Retention of the Glucose Unit Added by the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase Delays Exit of Glycoproteins from the Endoplasmic Reticulum. **J. Cell Biol.** **130** (1995) 771-779.
- 14- M. Sousa and A.J. Parodi: The Molecular Basis for the Recognition of Misfolded Glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase. **EMBO J.** **14** (1995) 4196-4203.

B) Revisiones bibliográficas / Review articles

- 1- A.J. Parodi: Protein N-glycosylation in Trypanosomatids. A Pathway with Odd Enzymes at Both Ends. **Biol. Res.** **26** (1993) 69-75.
- 2- A.J. Parodi: N-glycosylation in Trypanosomatid Protozoa. **Glycobiology** **3** (1993) 193-199.
- 3- A.J. Parodi: Biosynthesis of Protein-linked Oligosaccharides in Trypanosomatid Flagellates. **Parasitol. Today** **9** (1993) 373-377.
- 4- A.J. Parodi: Serendipity, or How Working with Glycoproteins from Trypanosomatids Changed my Life (With a Little Help from my Friends). **Ciência e Cultura** **46** (1994) 249-254.
- 5- S. Trombetta, M.A. Ferrero-García, M. Sousa y A.J. Parodi: Reacciones de Glucosilación de Proteínas en el Lumen del Retículo Endoplásmico. Su Posible Papel en el Plegamiento Proteico. En "Nuevos Conceptos Sobre el Desarrollo Estructural y Funcional de los Seres Vivos" (J. J. García-Marín, M. A. Serrano y A. Tabernero, eds.) pp. 107-118 (Ediciones Universidad de Salamanca, España, 1995).

PRESENTACIONES POR INVITACION EN CONGRESOS CIENTIFICOS / INVITED PRESENTATIONS IN SCIENTIFIC MEETINGS

A.J. Parodi:

- Simposio Iberoamericano Sobre Investigaciones Básicas en Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis (Caracas, Venezuela, 1993). Presentación: "Trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*: especificidad de la enzima e identificación del gen que la codifica". / *Ibero-American Symposium on Basic Research in Chagas Disease and Leishmaniasis* (Caracas, Venezuela, 1993). Presentation: "*Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase: Enzymatic, Specificity and Identification of the Gene".

- Simposio sobre Glicoconjugados, XXIX Reunión Anual, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Presentación: "Rol de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa en el plegamiento de glicoproteínas". / *Symposium on Glycoconjugates, XXIX Annual Meeting, Argentine Society for Biochemical Research (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 1993). Presentation: "The role of the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase in glycoprotein folding"*.
- Simposio sobre Maduración Conformacional de Proteínas en el Camino de Secreción, Trigésimo tercera Reunión Anual de la Sociedad Americana de Biología Celular (New Orleans, USA, 1993). Presentación: "UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase. Its Possible Involvement in Glycoprotein Folding". / *Symposium on Conformational Maturation of Proteins in the Secretory Pathway, Thirty-third Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (New Orleans, USA, 1993). Presentation: "UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase. Its Possible Involvement in Glycoprotein Folding"*.
- XVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (La Serena, Chile, 1994). Presentación: "Reacciones de Glucosilación en el Retículo Endoplásmico". / *XVII Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology (La Serena, Chile, 1994). Presentation: Glucosylation reactions in the Endoplasmic Reticulum"*.
- Simposio sobre Glicoconjugados. Quinto Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica (Salamanca, España, 1994). Presentación: " Glucosylation Reactions in the Endoplasmic Reticulum". / *Symposium on Glycoconjugates Fifth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry (Salamanca, Spain, 1994). Presentation: "Glucosylation Reactions in the Endoplasmic Reticulum"*.
- Conferencia Gordon de Investigación en Glicobiología (Oxnard, CA, U.S.A., 1995). Presentación: "The Interaction of the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase with Misfolded Glycoproteins". / *Gordon Research Conference on Glycobiology (Oxnard, CA, USA 1995). Presentation: "The Interaction of the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase with Misfolded Glycoproteins"*.

**COMUNICACIONES PRESENTADAS
EN CONGRESOS CIENTÍFICOS
NACIONALES E INTERNACIONALES /
COMMUNICATIONS PRESENTED IN
NATIONAL AND INTERNATIONAL
SCIENTIFIC MEETINGS**

- Conferencia Gordon de Investigación en Glicoproteínas y Glicolípidos, Ventura, California, EE.UU., 1993 / *Gordon Research Conference on Glycoproteins and Glycolipids, Ventura, California, U.S.A., 1993.*
- A.J. Parodi.: La especificidad de la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*. / *The specificity of Trypanosoma cruzi trans-sialidase.*
- XXIX Reunión Anual, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 1993 / *XXIX Annual Meeting Argentine Society for Biochemical Research, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 1993.*
- O. Campetella, A. Uttaro, A.J. Parodi y A.C.C. Frasch: Clonado de una trans-sialidasa activa de *Trypanosoma cruzi* sin el dominio inmuno-dominante / *Cloning of an active Trypanosoma cruzi trans-sialidase lacking the immunodominant domain.*
- XXX Reunión Anual, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Iguazú, Misiones, Argentina, 1994 / *XXX Annual Meeting Argentine Society for Biochemical Research, Iguazú, Misiones, Argentina, 1994.*

- A.J. Parodi, C. Labriola y J.J. Cazzulo: Algunas moléculas de cruzipaina, enzima lisosomal de *Trypanosoma cruzi*, tienen oligosacáridos de tipo complejo en su extremo C-terminal / *Some molecules of cruzipain, a Trypanosoma cruzi lysosomal enzyme, have complex-type oligosaccharides at their C-terminal end.*

- Conferencia Gordon de Investigación en Glicobiología, Oxnard, California, EE.UU., 1995 / *Gordon Research Conference on Glycobiology, Oxnard, California, U. S. A., 1995.*
 - C. Labriola, J.J. Cazzulo and A.J. Parodi: La retención de los residuos de glucosa agregados por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa produce un retardo en la salida de glicoproteínas del retículo endoplásmico. / *Retention of glucose units added by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum.*
 - M. Sousa and A.J. Parodi: Las bases moleculares de la glucosilación específica de glicoproteínas mal plegadas por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. / *The molecular basis for the specific glucosylation of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase.*
- XXXI Reunión Anual, Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Villa Giardino, Córdoba, Argentina, 1995 / *XXXI Annual Meeting Argentine Society for Biochemical Research, Villa Giardino, Cordoba, Argentina, 1995.*
 - F. Fernández y A.J. Parodi.: Una nueva proteína de stress: la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. / *A new stress protein: the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase.*
 - C. Labriola, J.J. Cazzulo y A.J. Parodi.: Modelo de control del plegamiento de glicoproteínas. Su comprobación usando *Trypanosoma cruzi* como modelo experimental. / *A model for the quality control of glycoprotein folding. The use of Trypanosoma cruzi as an experimental model for checking it.*

CONFERENCIAS DICTADAS EN INSTITUCIONES DEL EXTERIOR / LECTURES DELIVERED AT FOREIGN INSTITUTIONS

A.J. Parodi:

A Glycosyltransferase that Senses the Tertiary Structure of Glycoproteins. Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, USA, 1993.

The Role of the UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase in the Quality Control of Glycoprotein Folding. Department of Cell Biology, New York University, USA, 1995.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

Doctora de la Universidad de Buenos Aires Vivian Alvarez. "Enzimas Lisosomales. Biosíntesis y Translocación Hacia los Lisosomas en Invertebrados. Estudio de la Presencia parcial o Total del Camino Metabólico de la Manosa 6-Fosfato en *Chasmagnatus granulata*". / Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994. Vivian Alvarez, Ph.D. "Lysosomal Enzymes. Biosynthesis and Routing to Lysosomes in Invertebrates. Studies on the Total or Partial Presence of the Mannose 6-P-dependent Pathway in *Chasmagnatus granulata*". School of Sciences, University of Buenos Aires, 1994.

Doctor de la Universidad de Buenos Aires Marcelo Sousa. "La UDP-Glc:Glicoproteína Glucosiltransferasa es un

Sensor del Plegamiento de Glicoproteínas. Estudio de su Especificidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995. / Marcelo Sousa, Ph. D. "The UDP-Glc: glycoprotein Glucosyltransferase is a Sensor of Glycoprotein Folding. Studies on its Specificity". School of Sciences. University of Buenos Aires, 1995.

Doctora de la Universidad de Buenos Aires Silvana Merello. "Glicosilaciones no Convencionales en Protozoarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995. / Silvana Merello, Ph. D. "Non-conventional Glycosylations in Protozoa". School of Sciences, University of Buenos Aires, 1995.

TESINAS DE LICENCIATURA / DEGREE MINI-THESES

Licenciada en Biología Sandra Metzner. "Determinación de la Posición de los Oligosacáridos Unidos a Asparagina Presentes en la Cisteína-Proteinasa Principal de *Trypanosoma cruzi* (Cruzipaína)". Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad C.A.E.C.E., 1995. / Sandra Metzner, M. S. "Determination of the Position of Asparagine-linked Oligosaccharides Present in the Principal *Trypanosoma cruzi* Cysteine Proteinase (Cruzipain)". Department of Biological Sciences, C.A.E.C.E. University, 1995. Co-Directores: A.J. Parodi y J.J. Cazzulo.

SOCIEDADES CIENTIFICAS / SCIENTIFIC SOCIETIES

En el período cubierto por la presente memoria el Dr. A. Parodi ha sido Presidente y Presidente Saliente de la Sociedad de investigación Bioquímica (S.A.I.B.) y miembro del Comité Ejecutivo de la Asociación Panamericana de Bioquímica y Biología Molecular (P.A.B.M.B.). / During this period Dr. A. Parodi has been President and Past President of the Argentine Society for Biochemical research (S.A.I.B.) and a member of the Executive Committee of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (P.A.B.M.B.).

ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE PROMOCION DE LA CIENCIA / ACTIVITIES IN SCIENCE PROMOTION INSTITUTIONS

Durante el período cubierto por la presente memoria el Dr. A. Parodi ha sido miembro del Comité Editorial de Molecular and Biochemical Parasitology, Glycobiology y The FASEB Journal. / During this period Dr. A. J. Parodi has been a member of the Editorial Board of Molecular and Biochemical Parasitology, Glycobiology and The FASEB Journal.

SUBSIDIOS / GRANTS

A.J. Parodi:

- Institutos Nacionales de la Salud (EE.UU.) / National Institutes of Health (U.S.A.). 1993-1995.
- Organización Mundial de la Salud / World Health Organization, 1993-1995.
- Agencia Sueca para la Cooperación Científica con Países en Desarrollo (SAREC) / Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC), 1993-1995.
- Universidad de Buenos Aires / University of Buenos Aires. 1993-1995.

Lab 212

Laboratorio de Glicoproteínas de *Bacillus thuringiensis*

Laboratory of Glycoproteins from Bacillus thuringiensis

Personal Permanente / Permanent Staff

Manuel García Patrone

Glicoproteínas de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria de importancia práctica. Se usa para combatir plagas de la agricultura (larvas de lepidópteros y coleópteros) y vectores de enfermedades (mosquitos). Durante la esporulación acumula proteínas en forma de un cristal. Los componentes de este cristal desarrollan actividad insecticida por activación proteolítica en el tubo digestivo de larvas susceptibles.

Nosotros hemos encontrado dos glicoproteínas (205 y 72 kDa) en esporangios de *B. thuringiensis*. Fueron localizadas predominantemente en el exosporio y/o saco del espora, aunque también se encontró una pequeña proporción en membranas. Se ha descrito un método para la disociación de agregados hidrofóbicos que resisten las condiciones usuales de electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS. Usando este método se estableció que la glicoproteína de 205 kDa es un multímero de la de 72 kDa. La deglicosilación con ácido trifluorometanosulfónico de las glicoproteínas de 205 kDa y 72 kDa produjo un polipéptido de 54 kDa en ambos casos. Se encontraron tres especies de oligosacáridos unidos por enlace O-glicosídico a serinas del polipéptido de 54 kDa. Uno de los oligosacáridos presentó N-acetilgalactosamina en el extremo reductor, rhamnosa y un componente todavía no identificado.

Glycoproteins from *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis is a bacterium of practical importance: it is used to fight agricultural pests (lepidopteran and coleopteran larvae) and some sickness vectors (mosquitoes). It accumulates proteins in the form of a crystal during sporulation. The crystal components develop insecticidal activity by proteolytic activation in the gut of susceptible larvae.

We have found two glycoproteins (205 and 72 kDa) in *B. thuringiensis* sporangia. They were predominantly localized in the exosporium and/or the spore coat, although a small proportion was also found in membranes. A method for the dissociation of hydrophobic aggregates that resist the usual conditions of SDS-PAGE was described. Using this method we established that the 205 kDa glycoprotein is a multimer of the 72 kDa one. Deglycosylation of the 205 kDa and 72 kDa glycoproteins with trifluoromethane sulfonic acid yielded a 54 kDa polypeptide in both cases. At least three species of oligosaccharides were O-glycosidically linked to serines of the 54 kDa polypeptide chain. One of the oligosaccharides had N-acetylgalactosamine at the reducing end, rhamnose and a component not yet identified.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

- 1 - M. García Patrone and J.S. Tandecarz: A glycoprotein multimer from *Bacillus thuringiensis* sporangia: Dissociation into subunits and sugar composition. *Mol. Cell. Biochem.* **145** (1995) 29-37.

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS NACIONALES
E INTERNACIONALES / COMMUNICATIONS
PRESENTED IN NATIONAL AND
INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETINGS**

- XXX Reunión Anual de la SAIB, Puerto Iguazú, Misiones, Octubre de 1994.
- M. García Patrone y J.S. Tandecarz: Glicoproteínas de esporangios de *B. thuringiensis*.

**JURADOS DE CONCURSOS
DOCENTES / MEMBERSHIP OF
TRIBUNALS FOR THE APPOINTMENT
OF UNIVERSITY TEACHERS**

- Jurado para la provisión de 1 cargo de Jefe de Trabajos Prácticos. Diciembre de 1993. Instituto de Investigaciones Bioquímicas.
- Jurado para la provisión de 2 cargos de Ayudante de 2a. Marzo de 1995. Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

SUBSIDIOS / GRANTS

- CONICET 1993/1995. Subject: Bioquímica y Biotecnología Vegetal. Estudio sobre bacilos insecticidas.
- CONICET 1995. Subject: Glicoproteínas de *Bacillus thuringiensis*.

Lab 213

Laboratorio de Genética Bacteriana

Laboratory of Bacterial Genetics



Personal Permanente / Permanent Staff

Luis Ielpi

Angeles Zorreguieta

Becarios Post-Doctorales / Post-Doctoral Fellows

E. Alejandro Petroni (desde Octubre / *since October 1994*)

Tesistas / Ph. D. Students

Olga A. Castro (hasta Diciembre / *until December 1994*)

E. Alejandro Petroni (hasta Septiembre / *until September 1994*)

Federico Katzen

Flavio Devoto (hasta Mayo / *until May 1994*)

Verónica Ielmini (desde Abril / *since April 1995*)

Estudiantes Graduados / Graduate Students

Gustavo Vega (Abril-Agosto / *April-August 1993*)

Flavia Wald (Abril - Agosto / *April-August 1995*)

Estudiantes / Undergraduate Students

Cristian Oddo (desde Mayo / *since May 1994*)

Eyleen O'Rourke (desde Septiembre / *since September 1995*)

Diego Ferreira (desde Octubre / *since October 1995*)

El área de interés de nuestro laboratorio es la genética bacteriana. En particular estamos interesados en la genética molecular de la biosíntesis de exopolisacáridos. La importancia de los exopolisacáridos reside en su participación en la interacción con las células eucarióticas, generalmente asociadas con enfermedades en el hombre, animales, y plantas, y en sus cada vez mayores aplicaciones industriales. Como modelos estudiamos el xantano, producido por *Xanthomonas campestris*, los β -1,2-glucanos cíclicos producidos por la familia Rhizobiaceae y el acetano producido por *Acetobacter xylinum*.

1- Biosíntesis del xantano

Junto con el Dr. Marcelo A. Dankert de nuestro Instituto publicamos un estudio detallado sobre la biosíntesis del xantano, incluyendo el paso de polimerización (Ielpi et al., J. Bacteriol., 1993, 175: 2490-2500).

2- Nucleótidos azúcares precursores de polisacáridos

Durante este período hemos estudiado en colaboración con Nancy E. Harding y J. M. Cleary [Kelco (una división de Merck en ese entonces) California, EEUU] la interconversión de los nucleótidos azúcares precursores del xantano. Se aislaron y caracterizaron tres regiones de ADN, designadas *xpsIII*, *xpsIV*, y *xpsVI*. El análisis de la producción de xantano *in vitro* e *in vivo* y del contenido intracelular de nucleótidos azúcares determinó que las tres regiones son necesarias para la síntesis de los nucleótidos azúcares precursores del xantano. Estas tres regiones de ADN no están agrupadas entre sí, ni con la región *gum* o *xpsI* que codifica por las glicosiltransferasas, enzimas modificadoras y de secreción. (Harding et al. J. Gen. Microbiol., 1993, 139: 447-457).

El análisis por HPLC del contenido intracelular de los nucleótidos azúcares fue extendido a otros sistemas. En

Our laboratory is interested in the area of bacterial genetics. Particular area of emphasis are the molecular genetics of exopolysaccharide biosynthesis. The exopolysaccharides have been shown to play an important role in bacteria-eucariotic cells interaction, are commonly associated with diseases in man, animals and plants, and by its multiple industrial applications. As model, we are employing xanthan, produced by the plant pathogen *Xanthomonas campestris*, cyclic β -1,2-glucan produced by the Rhizobiaceae family, and acetan produced by *Acetobacter xylinum*.

1- Xanthan biosynthesis

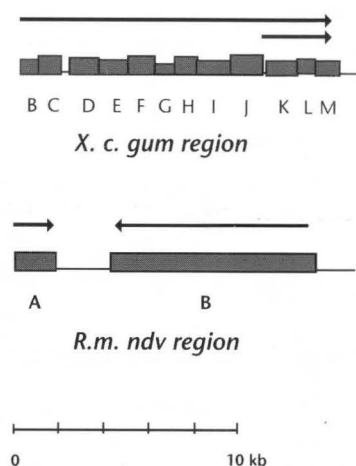
Together with Dr. Marcelo A. Dankert, from this Institute, a detailed study of xanthan biosynthesis, including the polymerization step has been published (Ielpi et al., J. Bacteriol., 1993, 175: 2490-2500).

2- Sugar nucleotide precursors of exopolysaccharides

In collaboration with Dr. Nancy Harding and Dr. J. M. Cleary from Kelco, (a Division of Merck and Co at that time) (California, USA) we have studied the interconversion of sugar nucleotide precursors of xanthan. We have isolated and characterized three DNA regions, designated *xpsIII*, *xpsIV*, and *xpsVI*. By analysis of xanthan production *in vitro* and *in vivo*, and HPLC analysis of the intracellular sugar nucleotide content, we show that these DNA regions are required for synthesis of sugar nucleotide precursors. We have also shown that these DNA regions are unlinked, and in a different location from those involved in synthesis of glycosyl transferases. (Harding et al., J. Gen. Microbiol., 1993, 139: 447-457).

The HPLC analysis of the intracellular sugar nucleotide content was extended to other systems. In collaboration with Dr. Rodolfo A. Ugalde and Antonio Uttaro from this Institute, it was shown that a mutation of *A. tumefaciens* termed *exoB*, resulted in the absence of endogenous UDP-galactose (Uttaro et al., J. Gen. Microbiol., 1993, 139:

Comparison of genetic organization of xanthan and β -1,2-glucan



colaboración con el Dr. Rodolfo A. Ugalde y Antonio A. Uttaro de este Instituto demostramos que en *A. tumefaciens* una mutación conocida como *exoB*, resulta en la ausencia de UDP-galactosa endógena (Uttaro et al. J. Gen. Microbiol., 1993, 139: 1055-1062).

3- Organización transcripcional de la región *xpsI* o *gum*

La región *xpsI* o *gum* de 16 kb contiene genes que codifican doce proteínas específicas, las cuales estarían involucradas en la síntesis, modificación y polimerización de las subunidades pentasacáridicas unidas a un aceptor poliprenol fosfato. El estudio de la organización transcripcional de esta región, realizado en colaboración con el grupo del Dr. Alfred Pühler, de la Universidad de Bielefeld, Bielefeld, Alemania, puso en evidencia la existencia de un promotor principal, situado inmediatamente antes del gen *gumB*, el cual es responsable de la transcripción de todos los genes. Se determinó la presencia de un promotor secundario, ubicado antes del gen *gumK*. Se determinaron los sitios de iniciación de ambos promotores (J. Bacteriol., en prensa).

4- Manipulación genética de *Acetobacter xylinum*

La manipulación genética de *Acetobacter xylinum* es dificultosa debido a la producción de celulosa, que engloba las células. Por esta razón hemos obtenido y caracterizado una mutante de *Acetobacter xylinum* deficiente en la síntesis de celulosa, pero productora de acetano, designada PEA-1 (Petroni and Ielpi. An. Asoc. Quím. Argent., 1993, 81: 225-234). Sin embargo, la frecuencia de introducción de ADN fue muy baja en la cepa PEA-1, al igual que en la cepa salvaje. Nuestros resultados sugieren que la baja frecuencia de introducción de ADN en *A. xylinum* se debería a la presencia de un sistema de modificación-restricción, que reconocería el tetranucleótido AATT (Mol. Cel. Biol., en prensa).

1055-1062).

3- Transcriptional organization of the *xpsI* or *gum* region

Genes for twelve specific proteins involved in the assembly, modification and polymerization of pentasaccharide subunits attached to a polyprenol phosphate carrier, are proposed to be encoded by the 16 kb *xpsI* or *gum* region. In order to study the transcriptional organization of this region, the promoters directing the expression of *gum* genes were mapped. This work was carried out in collaboration with Dr. Alfred Pühler's group, from Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany. The data demonstrated the existence of a main promoter. This promoter, located immediately upstream of *gumB*, is responsible for the transcription of the whole *gum* gene cluster. A second promoter was located upstream of *gumK*. Transcriptional start sites for both promoters were also determined (Katzen et al., J. Bacteriol., in press).

4- Genetic manipulation in *A. xylinum*

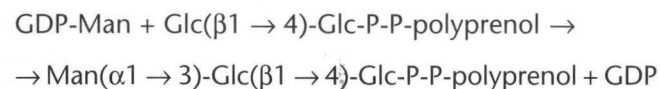
In addition to acetan *A. xylinum* produce cellulose which englobe the cells, difficulting genetic manipulation. As the first step to study the genetic aspects of acetan biosynthesis, we have obtained and characterized a cellulose deficient, acetan producer *A. xylinum* mutant, designated PEA-1. However, introduction and/or establishment of exogenous DNA in this bacterium was very low. Our results suggest the existence of a restriction-modification system, which recognizes the tetranucleotide AATT, responsible for the very low frequency of introduction and/or establishment of exogenous DNA in this bacterium (Petroni et al., Mol. Cel. Biol., in press).

5- Isolation of α -mannosyltransferase gene from *A. xylinum*

The isolation of structural glycosyltransferase genes involved in the biosynthesis of acetan by the ability of a

5- Aislamiento del gen que codifica la α -manosiltransferasa de *A. xylinum*

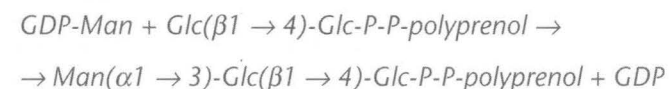
Debido a la imposibilidad de introducir DNA en *A. xylinum* B42 y su derivada deficiente en celulosa PEA-1, identificamos uno de los genes involucrados en la biosíntesis del acetano por complementación heteróloga. Además de compartir una estructura similar, las primeras cuatro reacciones del camino biosintético del acetano y xantano son catalizadas por un conjunto similar de glicosiltransferasas. Una mutante xantano-negativa debido a una deficiencia en el tercer paso del camino biosintético pudo ser complementada por una biblioteca genómica de *A. xylinum*. El gen correspondiente pudo ser aislado y secuenciado. El gen codifica por la enzima GDP-manosa:celobiosil-difosfopoliprenol α -manosiltransferasa, que cataliza la transferencia de un residuo α -manosa desde GDP-manosa a celobiosa-P-P-poliprenol (J. Bacteriol., en prensa).



6- Familia de α -manosiltransferasas bacterianas

La comparación de la α -manosiltransferasa de *A. xylinum* con α -manosiltransferasas conocidas mostró que todas las α -manosiltransferasas bacterianas tienen en común en la región COOH terminal el motivo EXFGXXXE. En un trabajo en colaboración con el Dr. Bernard Henrissat y el Dr. Roberto Geremía, del Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble, Francia, encontramos un motivo mas degenerado presente en α -manosiltransferasas bacterianas involucradas en la biosíntesis de lipo- y exo-polisacáridos, como así también en algunas proteínas eucarióticas (Biochem. J., en prensa).

B42 genomic library to complement acetan defective mutants, was impaired by the unsuccessful introduction of DNA into *A. xylinum* B42 and its cellulose-deficient derivative PEA-1, possibly by the presence of a DNA modification-restriction system (see above). An alternative way let us identify one of the genes involved in acetan biosynthesis. In addition to share a similar structure, the first four reactions of acetan and xanthan repeating unit assembly are catalyzed by a set of similar glycosyltransferase enzymes. A xanthan defective mutant deficient in the third step of the repeating unit biosynthesis, could be complemented by the genomic library of *A. xylinum*. The *A. xylinum* gene, which codes for the GDP-mannose: cellobiosyl-diphosphopolyprenol α -mannosyltransferase enzyme, could be identified and sequenced (J. Bacteriol., in press). The enzyme catalyzes the transference of an α -mannosyl residue from GDP-mannose to cellobiose-P-P-polyprenol:



6- Family of bacterial α -mannosyl transferases

A search for similarities of *A. xylinum* α -mannosyltransferase with other known mannosyltransferases revealed that all bacterial α -mannosyltransferases have the consensus motif EXFGXXXE at the COOH-terminus. Collaborative work with Dr. Bernard Henrissat and Dr. Roberto Geremía from Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble, France, has led to find that a more degenerated motif is conserved among all α -mannosyl transferases involved in the biosynthesis of bacterial lipo- and exopolysaccharides, as well as in some eukaryotic proteins (Biochem. J., in press).

7- Biosynthesis of cyclic β -(1,2)-glucans

Members of the Rhizobiaceae family produce cyclic β -(1,2)-glucans that are proposed to play a role in plant-bacteria interaction. We studied the β -(1,2)-glucans synthesis in *R.*

7- Biosíntesis de glucanos β -(1,2)-cíclicos

Miembros de la familia Rhizobiaceae producen glucanos β -(1,2)-cíclicos que jugarían un papel en la interacción planta-bacteria. En este período estudiamos la síntesis de los β -(1,2)-glucanos en *R. leguminosarum* biovars *viciae phaseoli* y *trifolii*. Encontramos que estas cepas sintetizan una familia de glucanos β -(1,2)-cíclicos a través de oligosacáridos intermediarios unidos a una proteína aceptora ligeramente mayor que la proteína de 319 kDa descrita en *R. meliloti* (Castro et al., Arch. Microbiol., 1995, 163: 454-462).

Estudiamos también las actividades requeridas para la biosíntesis del glucano, incluyendo la transferencia de la primer glucosa, la elongación de la cadena oligosacáridica, y la reacción de ciclación. Los resultados obtenidos empleando PAGE y "marcado en gel", sugirieron que las tres actividades enzimáticas residen en un único componente proteico, y que esta proteína es la proteína aceptora de 319 kDa (J. Bacteriol., en prensa).

8- Análisis bioquímico y genético de la infección por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa de forma espiralada aislada del estómago humano. Numerosos estudios han demostrado asociación entre la presencia de este organismo y la gastritis antral. Además, la infección por *H. pylori* es un pre-requisito para contraer la úlcera péptica y posiblemente el carcinoma gástrico. *H. pylori* es una bacteria persistente. Una vez adquirida, la infección permanece por años, posiblemente por décadas. Actualmente la única forma conocida para erradicar la infección es mediante la administración conjunta de varios antimicrobianos. Aunque la infección por *H. pylori* es muy común, sólo una pequeña fracción de la población infectada desarrolla úlcera péptica. El proceso de infección de *H. pylori* es poco conocido. Actualmente se estudian varios

leguminosarum biovars *viciae phaseoli* and *trifolii*. We found that these strains synthesize a family of cyclic β -(1,2)-glucans through oligosaccharides intermediates bound to a inner membrane protein, slightly higher than the 319-kDa protein described in *R. meliloti*. (Castro et al., Arch. Microbiol., 1995, 163: 454-462).

In addition, we are studying the activities required for glucans biosynthesis, including the transfer of the first glucose, the elongation, and the cyclization reaction. Results using native PAGE and "in gel labeling", suggest that the three enzymatic activities reside in an unique protein component, and that this protein is the 319 kDa acceptor (J. Bacteriol., in press).

8- Biochemical and genetic analysis of *Helicobacter pylori* infection

Helicobacter pylori is a spiral shaped gram negative bacterium present in the human stomach. Numerous studies have demonstrated a strong association between the presence of this organism and antral gastritis. *H. pylori* infection is also a pre-requisite for the occurrence of peptic ulcers and possibly gastric carcinoma. *H. pylori* is a persistent bacterium. Once acquired, the infection persists for years, possibly for decades, presumably evading the host immune response. *H. pylori* infection is very common, yet only a small fraction of the infected population develop peptic ulcer.

Little is known about the pathogenesis of *H. pylori* infection. Several potential virulence factors are suspected to play a role in the pathogenesis process of gastritis as well as ulcer formation. Those studied in most detail are an increased bacterial motility, and the production of abundant amounts of urease, an extracellular cytotoxin (vacuolating cytotoxin), and a zinc metalloprotease.

The objective of this study is to identify the factors associated to the persistency of the gastroduodenal infections.

factores de virulencia que participarían en el proceso de la gastritis y de la formación de la úlcera. Los factores más estudiados son la motilidad bacteriana, la producción de ureasa, una citotoxina extracelular (citotoxina vacuolante), y una zinc metaloproteasa. El objetivo de nuestro estudio es identificar factores asociados a la persistencia de la infección gastroduodenal.

PUBLICACIONES / RECENT PUBLICATIONS

A) Publicaciones Originales / Original Publications

- 1- N.E. Harding, S. Raffo, A. Raimondi, J.M. Cleary and L. Ielpi: Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. **J. Gen. Microbiol.** **139** (1993) 447-457.
- 2- A. Uttaro, L. Ielpi and R.A. Ugalde: Galactose metabolism in *Rhizobiaceae*: characterization of *Agrobacterium tumefaciens* *exoB* mutants. **J. Gen. Microbiol.** **139** (1993) 1055-1062.
- 3- L. Ielpi, R.O. Couso and M.A. Dankert: Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.** **175** (1993) 2490-2500.
- 4- E.A. Petroni and L. Ielpi: Isolation and characterization of a cellulose-negative, acetan-producer mutant of *Acetobacter xylinum*. **An. Asoc. Quím. Argent.** **81** (1993) 225-234.
- 5- M.A. Barbieri, M.A. Sosa, R.O. Couso, L. Ielpi, S. Merello, C.E. Tonn and F. Bertini: Affinity sites for N-acetyl- β -D-glucosaminidase on the surface of rate epididymal spermatozoa. **Internat. J. Androl.** **17** (1994) 43-49.
- 6- O.A. Castro, A. Zorreguieta, C. Semino and L. Ielpi: Biosynthesis of cyclic β -(1,2)-glucans in *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *phaseoli* and *trifolii*. **Arch. Microbiol.** **163** (1995) 454-462.

B) Capítulos en libros / Chapters in books

- 1- N.E. Harding, J.M. Cleary and L. Ielpi: Genetics and Biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. Chapter 12. In: *Food Biotechnology: microorganisms*. V.H. Hui and G.G. Khachatourians, (ed.). VCH Publishers, New York, pp. 495-514, 1995.

CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS / CONGRESSES AND SCIENTIFIC MEETINGS

- XXIX Reunión Anual de la SAIB. Carlos Paz, Córdoba, 1993.
 - L. Ielpi: Disertante en el simposio "Regulación de la expresión génica en procariotes". Tema presentado: "Genética de la síntesis de polisacáridos".
 - O.A. Castro, G. Vega, A. Zorreguieta y L. Ielpi. Relación entre la estructura y función del sistema de síntesis y transporte del glucano β -(1,2)-cíclico de *Rhizobiaceae*.
- XXX Reunión Anual de la SAIB. Iguazú, Misiones, 1994.
 - F. Katzen, A. Zorreguieta y L. Ielpi: Identificación de un elemento promotor en la región *xps* de *Xanthomonas campestris*.
 - O.A. Castro, A. Zorreguieta y L. Ielpi: La proteína ChvB contendría todas las actividades necesarias para la síntesis del glucano β -(1,2)-cíclico en *A. tumefaciens*.
- Annual Meeting of the Genetic Society. Bielefeld, Alemania, Septiembre 1995.
 - F. Katzen, A. Becker, A. Zorreguieta, L. Ielpi and A. Pühler: Mapping of promoters located on the *gum* region of *Xanthomonas campestris*.
- XXXI Reunión Anual de la SAIB. Villa Giardino, Córdoba, 1995.
 - E.A. Petroni y L. Ielpi: Alfa-manosil transferasa de *Acetobacter xylinum*.
 - E.A. Petroni, R. Geremía, B. Henrissat y L. Ielpi: Una familia de alfa-manosiltransferasas bacterianas.
 - F. Katzen, A. Becker, A. Zorreguieta, A. Pühler y L. Ielpi: Mapeo de promotores en la región *gum* de *Xanthomonas campestris*.

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- E. Alejandro Petroni. "Análisis Genético-Molecular y Bioquímico de Genes Esenciales en la Biosíntesis de Exopolisacáridos en Bacterias Gram-negativas" / "Molecular Genetics and Biochemistry Analysis of Essential Genes in the Biosynthesis of Exopolysaccharides in Gram-negative Bacteria". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Septiembre 1994. Director: L. Ielpi.
- Olga A. Castro. "Estudios Genéticos y Moleculares sobre la Biosíntesis de los Glucanos β -(1,2)-Cíclicos en *Rhizobiaceae*" / "Genetics and Molecular Studies on the Cyclic β -(1,2)-Glucans biosynthesis in *Rhizobiaceae*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Noviembre 1994. Director: L. Ielpi.

CURSOS DE POST-GRADO / POST-GRADUATE COURSES

Profesor invitado al primer curso internacional "Aplicaciones de la Biología Molecular al estudio de las Interacciones entre plantas y microorganismos" / Invited Professor in the 1st International Course on "Application of Molecular Biology to the study of the interaction between plants and microorganisms", coordinado por el Dr. Mario Aguilar, Universidad Nacional de La Plata, marzo de 1994.

**VISITANTES EXTRANJEROS RECIBIDOS/
FOREIGN VISITORS**

- Marcelo E. Tolmasky (Julio-agosto 1993 y Junio 1995) (Oregon Health Science University, Portland, Oregon, EEUU).
- Alfred Pühler.(Febrero 1995). Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany.

**JURADO DE TESIS DE
LICENCIATURA / MEMBERSHIP OF
DEGREE MINI-THESES TRIBUNALS**

Luis Ielpi:

Para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, de Eva M. Rosen. Genes de reparación. Recombinación del ADN y la inducción de la escisión precisa del transposón Tn10 / *Genes of repairation. DNA recombination and induced precise escision of transposon Tn10*. Director: Dra. Rosa Nagel. 1994.

**JURADO DE TESIS / MEMBERSHIP OF
PH.D. THESES TRIBUNALS**

Luis Ielpi:

Para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, de Aníbal R. Lodeiro. Fisiología de las interacciones tempranas planta-bacteria: asociación de rizobios y leguminosas para la fijación simbiótica de Nitrógeno / *Physiology of early stages of plant-bacteria interactions: association of Rhizobia to legumes in symbiotic Nitrogen fixation*. Director: Dr. Gabriel Favelukes. 1994.

Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, de Marcelo Souza. La UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa es un sensor del plegamiento de glicoproteínas. Estudio de su especificidad / *The UDP-Glc: glucoprotein glucosyltransferase is a sensor of glycoprotein folding. Studies of its specificity*. Director: Dr. Armando Parodi. 1995.

**JURADO DE CONCURSOS DOCENTES
/ MEMBERSHIP OF TRIBUNALS FOR
THE APPOINTMENT OF UNIVERSITY
TEACHERS**

Angeles Zorreguieta:

Miembro del jurado titular para designar docentes auxiliares dedicación exclusiva y parcial/ *to appoint auxiliary teachers, part-time and full-time*, Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

Luis Ielpi:

Para designar docentes auxiliares dedicación exclusiva y parcial / *To appoint auxiliary teachers, part-time and full-time*, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.

Para designar jefe de trabajos práctico, dedicación exclusiva / *To appoint a teacher in charge of practicals, full-time*. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

SUBSIDIOS / GRANTS

Angeles Zorreguieta:

- Universidad de Buenos Aires (1995).

Federico Katzen:

- Deutscher Akademischer Austauschdienst (1995).
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 223) (1995).

Luis Ielpi:

- Universidad de Buenos Aires, from 1992 to date.
- CIPAGRO (Agricultural Research Commission) (1992-1994).
- CONICET (Argentine National Research Council) (1993-1994).
- Kelco, a Division of Merck & Co. (From July 1993 to June 1994).
- Laboratorios Bagó (1995).

PARTICIPACION EN LA GESTION UNIVERSITARIA / UNIVERSITY ACADEMIC APPOINTMENTS

Luis Ielpi:

Miembro electo del Consejo Departamental / *Elected member of the Departmental Council*, Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993-1994 y 1995-1996.

Miembro electo del Consejo Directivo / *Elected member of the Directive Council*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por el período 1994-1998.

VIAJES REALIZADOS / TRAVELS ABROAD

Federico Katzen:

Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany (1995).

Luis Ielpi:

Kelco, a Division of Merck, San Diego, California, USA (1994).

Oregon Health Science University, Portland, Oregon, USA (1994, 1995).

Lab 302

Laboratorio de Bioquímica de Parásitos

Laboratory of Biochemistry of Parasites



Personal Permanente / Permanent Staff.

Juan José Cazzulo

Oscar Eduardo Campetella (hasta Julio /until July 1995)

Vilma Gladys Duschak

Personal Técnico Profesional / Technical Staff

Berta María Franke de Cazzulo

Becarios Post-Doctorales / Post-Doctoral Fellows

Mirtha Brignoni (desde Marzo / since March 1995)

Tesistas / Ph. D. Students

Javier Augusto Martinez (hasta Abril / until April 1995)

Patricia Barderi

Carlos Labriola

Fernán Agüero (desde Enero / since January 1995)

Denise Muñoz (desde Marzo / since March 1994)

Fabiola Parussini (desde Marzo / since March 1995)

Estudiantes de Pre-grado / Undergraduate Students

Fernán Agüero (hasta Diciembre /until December 1994)

Catabolismo de glucosa, proteínas y amino ácidos por *Trypanosoma cruzi*

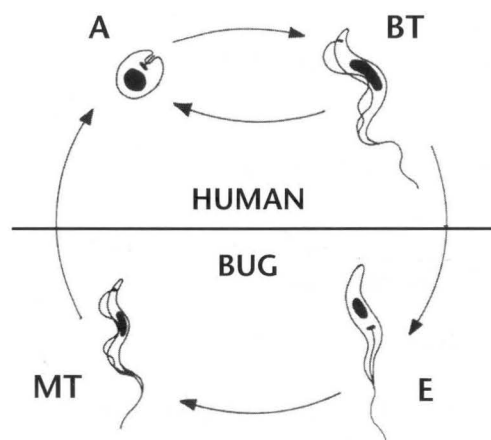
Trypanosoma cruzi, el hemoflagelado que causa la enfermedad de Chagas, cataboliza la glucosa sólo parcialmente hasta CO_2 , aún en condiciones aeróbicas, excretando una fracción considerable del carbono de la glucosa como productos reducidos, esencialmente succinato y alanina. La enzima clave en el desvío del catabolismo glicolítico normal hacia la producción de succinato es la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), la cual hemos purificado y caracterizado recientemente en colaboración con el Dr. J.J. B. Cannata, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Hemos llevado a cabo también estudios sobre otras enzimas importantes de esta vía, en particular sus propiedades regulatorias y localización subcelular. La producción de catabolitos de la glucosa durante el crecimiento de cultivos del parásito fue estudiada por ensayo enzimático de los catabolitos producidos, y también por ^{13}C -NMR, siguiendo el consumo de glucosa y la aparición de productos durante la incubación de suspensiones espesas de los parásitos con $(1 - ^{13}\text{C})$ -glucosa. Hemos propuesto recientemente un posible papel de las enzimas del catabolismo de amino ácidos (ver más adelante) en la reoxidación del NADH glicolítico, ligada a la producción y excreción de L-alanina.

T. cruzi es capaz de degradar proteínas, las cuales parecen ser una importante fuente de energía. Hemos aislado y purificado hasta homogeneidad proteica una cisteína proteinasa (CP), la cruzipaina, que es una glicoproteína localizada en los lisosomas. El gen que codifica la enzima predice dominios de pre- y pro-enzima, un dominio catalítico central con alta homología con las catepsinas S y L, y un dominio C-terminal de 130 amino ácidos, el cual ha sido descrito hasta ahora sólo en enzimas similares de *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* spp. En este momento estamos intentando la caracterización de las múltiples

Catabolism of glucose, proteins and amino acids by *Trypanosoma cruzi*

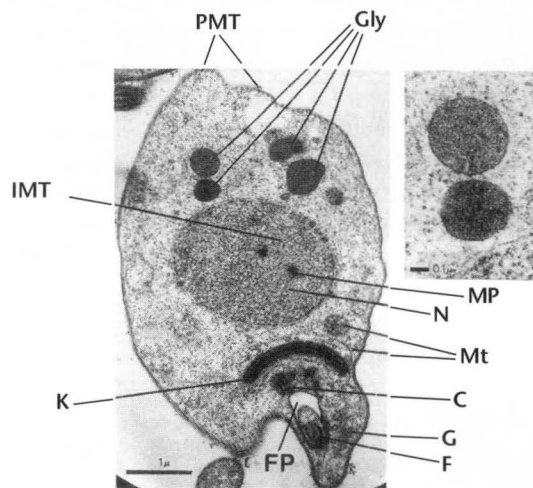
Trypanosoma cruzi, the hemoflagellate which causes the American Trypanosomiasis, Chagas Disease, catabolizes glucose only partially to CO_2 , even under aerobic conditions, excreting a considerable fraction of glucose carbon into the medium as reduced products, mainly succinate and alanine. The key enzyme responsible to divert glucose carbon from the normal glycolytic pathway to succinate is phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which we have recently purified to homogeneity and characterized in collaboration with Dr. J.J.B. Cannata, from the Faculty of Medicine, University of Buenos Aires. We have also performed studies on other enzymes involved in this pathway, including their regulatory properties and subcellular localization. The production of catabolites from glucose was studied during growth of parasite cultures, by enzymatic assay of the catabolites produced, and also by ^{13}C -NMR, following glucose consumption and product appearance during incubation of thick suspensions of the parasites with $(1 - ^{13}\text{C})$ -glucose. We have recently proposed a possible role of enzymes from amino acid catabolism (see below) in the reoxidation of glycolytic NADH, linked to L-alanine production and excretion.

T. cruzi is able to degrade proteins, which seem to be an important source for energy metabolism. We have isolated and purified to protein homogeneity a cysteine proteinase (CP), cruzipain, which is a glycoprotein located in the lysosomes. The gene coding for the enzyme predicts pre- and pro- enzyme domains, a central domain with high homology to cathepsins S and L, and a 130-amino acid C-terminal domain, which is shared so far only by similar enzymes from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp. We are progressing at present in the characterization of the multiple post-translational modifications present in this domain. We have recently shown heterogeneities in both, amino acid sequence and carbohydrate composition, in the C-terminal domain, which might account for the microheterogeneities observed in natural cruzipain. We



Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. The different stages of the parasite in the triatomine insect vector (bug) and the mammalian host (human) are shown.

Abbreviations: A, amastigotes (intracellular form); BT, bloodstream trypomastigotes; E, epimastigotes, and MT, metacyclic trypomastigotes. A and E are the replicative forms predominant in the mammal and in the vector, respectively.



Electron micrograph of a *Trypanosoma cruzi* culture epimastigote. F, axoneme of the flagellum; FP, flagellar pocket; K, kinetoplast (the dark curved mass corresponds to the kinetoplast DNA), Mt, mitochondrial membrane; C, centriole; N, mitotic nucleus, showing mitotic plaques (MP) and intranuclear microtubules (IMT); PMT, periplast microtubules, which strengthen the plasma membrane (PM); G, Golgi; Gly, glycosomes (x 11,700). Inset glycosomes at a higher magnification (x 32,500). Courtesy of Professor Alberto J. Solari, Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

modificaciones post-traduccionales presentes en este dominio. Recientemente hemos demostrado heterogeneidades tanto en secuencia de amino ácidos como en composición en carbohidrato en el dominio C-terminal, las cuales podrían ser la causa primaria de las microheterogeneidades observadas en la cruzipaina natural. Hemos purificado por cromatografía de afinidad, usando cystatin-Sepharose y ConA-Sepharose, CPs similares a la cruzipaina presentes, en bajos niveles, en *Trypanosoma rangeli* y *Crithidia fasciculata*; en el primer caso hemos clonado y secuenciado varios genes codificantes de la CP, la cual es altamente homóloga con la cruzipaina. Parte de estos estudios fue llevada a cabo en colaboración con los Profesores A.C.C. Frasch y A.J. Parodi, de nuestro Instituto, y con el Profesor Ulf Pettersson y la Dra. Lena Åslund (Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Suecia) y el Dr. Ulf Hellman (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Suecia). Hemos iniciado recientemente un nuevo proyecto colaborativo, con el Profesor Vito Turk y la M.Sc. Veronika Stoka (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Eslovenia), el cual ya ha proporcionado información sobre los efectos de cystatinas sobre la actividad de cruzipaina, y tiene como objetivo último la elucidación de la estructura de la cruzipaina madura por cristalografía de rayos X.

El uso de inhibidores irreversibles de CPs capaces de penetrar en la célula del parásito nos ha permitido demostrar que la cruzipaina, u otra CP, es esencial en las etapas de diferenciación involucradas en el ciclo de vida del parásito. Estos estudios, llevados a cabo en colaboración con el Profesor Graham Coombs, Department of Zoology, University of Glasgow, y el Dr. Michael J. North, University of Stirling, Scotland, junto con estudios de otros grupos, plantean la posibilidad de desarrollar nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas basadas en inhibidores de CPs.

T. cruzi contiene altas actividades de glutamato dehidrogenasa ligada al NADP (NADP-GDH); hemos

have purified by affinity chromatography techniques, using cystatin-Sepharose and ConA-Sepharose, CPs similar to cruzipain present, at very low levels, in *Trypanosoma rangeli* and *Crithidia fasciculata*, in the former case we were able to clone and sequence several genes encoding the enzyme, which is highly homologous to cruzipain. Part of these studies has been performed in collaboration with Professors A.C.C. Frasch and A.J. Parodi, from our Institute, and Professor Ulf Pettersson and Dr. Lena Åslund (Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Sweden) and Dr. Ulf Hellman (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Sweden). We have started recently a new collaborative project, with Professor Vito Turk and M.Sc. Veronika Stoka (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia), which has already given information on the effects of cystatins on the cruzipain activity, and aims to the elucidation of the structure of the mature enzyme by X-ray crystallography.

Using irreversible CP inhibitors able to permeate the parasite cell, we have shown that cruzipain, or another CP, is essential in the differentiation steps involved in the parasite's life cycle. These studies, performed in collaboration with Professor Graham Coombs, Department of Zoology, University of Glasgow, Scotland, and Dr. Michael J. North, University of Stirling, Scotland, together with those of other groups, open up the possibility of developing new drugs against Chagas disease based on CP inhibitors.

T. cruzi contains high activities of NADP-linked glutamate dehydrogenase (NADP-GDH); we have recently obtained the complete sequence of the enzyme, both by direct peptide sequencing (about 30% of the molecule) and by cloning and sequencing its gene, and shown that it has about 70% of identity compared with the *E. coli* NADP-GDH.

T. cruzi epimastigotes contain two enzymes of aromatic amino acid catabolism, tyrosine aminotransferase (TAT) and an aromatic α -hydroxy acid dehydrogenase (AHADH),

obtenido recientemente la secuencia completa de la enzima, por secuenciación directa de péptidos (alrededor de 30% de la molécula) y por clonado y secuenciación del gen que la codifica, demostrando que presenta un 70% de identidad comparada con la enzima de *E. coli*.

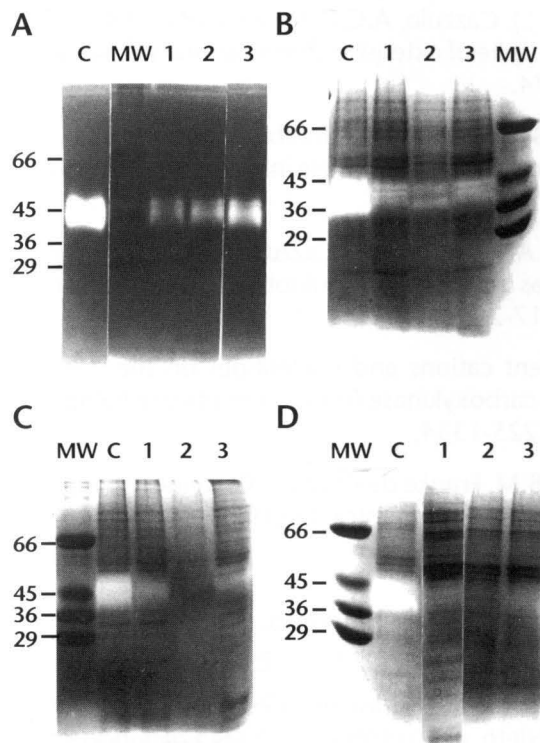
Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen dos enzimas del catabolismo de amino ácidos aromáticos, la tirosina aminotransferasa (TAT) y una α -hidroxiácido dehidrogenasa aromática (AHADH), además de las GDHs y de transaminasas como alanina y aspartato aminotransferasas (ALAT y ASAT). Hemos purificado la TAT y la AHADH hasta homogeneidad y las hemos caracterizado cinéticamente y por secuenciación parcial. Hemos progresado también en la purificación de una de las actividades principales de ALAT; hemos demostrado, utilizando TAT natural y TAT recombinante expresada en *E. coli*, que la otra actividad importante de ALAT pertenece a la molécula de la TAT. Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el Profesor J.A. Santomé y las Dras. Cristina Nowicki y Marisa Montemartini, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, y con los Dres. Andrés M. Ruiz, J. Búa y Esteban Bontempi, del Instituto Fatale Chabén, Buenos Aires.

in addition to the GDHs and transaminases like alanine- and aspartate-aminotransferases (ALAT and ASAT). We have purified TAT and AHADH to homogeneity and characterized them kinetically and by partial sequencing, and have progressed in the purification of one of the major ALAT activities; we have shown, by using both natural enzyme and recombinant TAT expressed in E. coli, that the other important ALAT activity belongs to the TAT molecule. These studies have been performed in collaboration with Professor J.A. Santomé and Drs. Cristina Nowicki and Marisa Montemartini, from the Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, and with Drs. Andrés M. Ruiz, J. Búa and Esteban Bontempi, from the Instituto Fatale Chabén, Buenos Aires.

PUBLICACIONES / PUBLICATIONS

A) Publicaciones originales / Original publications

- 1- E.L. Malchiodi, M.G. Chiaramonte, J.A. Martínez, N.W. Zwirner, R.A. Margni and J.J. Cazzulo: Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* and an antigen (Ag163B6) isolated with a monoclonal antibody. **Immunol. Lett.** **35** (1993) 59-62.
- 2- C. Labriola, M. Sousa and J.J. Cazzulo: Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. **Biological Res.** **26** (1993) 101-107.
- 3- J. Martínez, O. Campetella, A.C.C. Frasch and J.J. Cazzulo: The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. **Immunol. Lett.** **35** (1993) 191-196.



Inhibition of cruzipain isoforms in the four major stages of *Trypanosoma cruzi* in vivo, detected by SDS-PAGE in gelatin-containing gels. Epimastigotes (A), metacyclic trypomastigotes (B), amastigotes (C) and Vero cell culture-trypomastigotes (D) were suspended in MEM and incubated with the inhibitors Z-FK-AMK (1), Z-FF-DMK (2) or Z-FA-DMK (3) at 20 μ M. After 3 hr at 28 (A, B) or at 37°C (C, D) the cells were washed, disrupted and submitted to gelatin-SDS-PAGE. C, control without inhibitors; MW, molecular mass markers. After electrophoresis, the washed gels were incubated in the presence of 2-mercaptoethanol at pH 6, to develop the enzyme activity, and stained with Coomassie Blue. (Franke de Cazzulo *et al.* (1994) FEMS Microbiol Lett. 124, 81-86)

- 4- G.D. Pollevick, D.O. Sánchez, O. Campetella, S. Trombetta, M. Sousa, J. Henriksson, U. Hellman, U. Pettersson, J.J. Cazzulo and A.C.C. Frasch: Members of the SAPA/trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. **Mol. Biochem. Parasitol.** **59** (1993) 171-174.
- 5- M. Montemartini, J.A. Santomé, J.J. Cazzulo and C. Nowicki: Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** **292** (1993) 901-906.
- 6- P. Barderi, C. Labriola, J. Martínez, A. Coira, M. Bravo, A. Raimondi and J.J. Cazzulo: Improved purification methods for the NADP-linked glutamate dehydrogenase, cruzipain, and its C-terminal domain from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Anales Asoc. Quím. Argentina** (número especial en homenaje al Dr. R.M. Couso) **81** (1993) 89-99.
- 7- M. Montemartini, J. A. Santomé, J. J. Cazzulo and C. Nowicki: Production of aromatic α -hydroxy acids by epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, and its possible role in NADH re-oxidation. **FEMS Microbiol. Lett.** **118** (1994) 89-92.
- 8- G. Gonzalez, A. Orn, J.J. Cazzulo and K.-O. Grönvik: Production and characterization of monoclonal antibodies against the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.** **40** (1994) 389-394.
- 9- M. Montemartini, J.A. Santomé, J.J. Cazzulo and C. Nowicki: Purification and partial structural and kinetic characterization of an aromatic L- α -hydroxy acid dehydrogenase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **68** (1994) 15-23.
- 10- B. M. Franke de Cazzulo, J. Martínez, M.J. North, G.H. Coombs and J.J. Cazzulo: Effect of proteinase inhibitors on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** **124** (1994) 81-86.
- 11- C.D. Robertson, J. Martinez, J.J. Cazzulo and G.H. Coombs: Analysis of the cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* using specific antisera. **FEMS Microbiol. Lett.** **124** (1994) 191-194.
- 12- A.J. Parodi, C. Labriola and J.J. Cazzulo: The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **69** (1995) 247 - 255.
- 13- J. Martínez, J. Henriksson, M. Ridåker, J.J. Cazzulo and U. Pettersson: Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. **FEMS Microbiol. Lett.** **129** (1995) 135-142.
- 14- C. Labriola and J.J. Cazzulo: Purification and partial characterization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma rangeli*. **FEMS Microbiol. Lett.** **129** (1995) 143-148.
- 15- C. Cymeryng, J.J. Cazzulo and J.J.B. Cannata: Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and physicochemical and kinetic properties. **Mol. Biochem. Parasitol.** **73** (1995) 91-101.
- 16- F. Agüero, Y. Repetto, U. Hellman and J.J. Cazzulo: Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **72** (1995) 247-251.

- 17- C. Labriola, J.J. Cazzulo and A.J. Parodi: Retention of glucose units added by UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **130** (1995) 771-779.
- 18- J. Henriksson, B. Porcel, M. Ridåker, A. Ruiz, V. Sabaj, N. Galanti, J.J. Cazzulo, A.C.C. Frasch and U. Pettersson: Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73** (1995) 63-74.
- 19- V. Stoka, M. Nycander, B. Lenarcic, C. Labriola, J.J. Cazzulo, I. Björk and V. Turk: Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. *FEBS Lett.* **370** (1995) 101-104.
- 20- M. Montemartini, J. Búa, E. Bontempi, C. Zelada, A.M. Ruiz, J.A. Santomé, J.J. Cazzulo and C. Nowicki: A recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* has both, tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities. *FEMS Microbiol. Lett.* **133** (1995) 17-20.
- 21- M.S. Salvarrey, J.J. Cazzulo and J.J.B. Cannata: Effects of divalent cations and nucleotides on the ^{14}C -oxaloacetate exchange catalysed by the phosphoenol-pyruvate carboxykinase from the moderate halophile, *Vibrio costicola*. *Biochem. Mol. Biol. International* **36** (1995) 1225-1334.
- 22- J.J. Cazzulo, C. Labriola, F. Parussini, V. Duschak, J. Martinez and B.M. Franke de Cazzulo: Cysteine proteinases in *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatid parasites. *Acta Chim. Slovenica* **42** (1995) 409-418.

B) Revisiones bibliográficas / Review articles

- 1- J.J. Cazzulo: Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomemb.* **26** (1994) 157-165 (issue on "The Bioenergetics of Trypanosomatids" (F.R. Opperdoes, ed.).
- 2- J.J. Cazzulo: Structure, antigenicity and possible functions of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. In: *Biology of Parasitism* (R. Ehrlich and A. Nieto, eds.) (1994) pp. 1 - 8. Ediciones Trilce, Montevideo, Uruguay.

VISITAS CORTAS A LABORATORIOS / SHORT VISITS TO LABORATORIES

- El Dr. Cazzulo visitó el Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, y el Department of Medical Genetics, Biomedical Center, University of Uppsala, Suecia, para trabajos colaborativos con el Dr. Ulf Hellman y el Profesor Ulf Pettersson, respectivamente, entre el 15 y el 27 de Marzo de 1993; entre el 9 y 20 de Agosto de 1993; entre el 18 de Febrero y el 3 de Marzo de 1994; entre el 21 y 26 de Noviembre de 1994; entre el 10 y 25 de Junio de 1995 y entre el 13
- Dr. Cazzulo visited the Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, and the Department of Medical Genetics, Biomedical Center, University of Uppsala, Sweden, for collaborative work with Dr. Ulf Hellman and Professor Ulf Pettersson, respectively, from March 15th to 27th, 1993; from August 9th to 20th, 1993; from February 18th to March 3rd, 1994; from November 21st to 26th, 1994; from June 10th to 25th, 1995 and from September 13th to 19th, 1995.

y 19 de Septiembre de 1995.

El Dr. Cazzulo visitó al Dr. James A. Dvorak, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, U.S.A. entre el 27 y el 30 de Marzo de 1993.

El Dr. Cazzulo visitó el Department of Biochemistry and Molecular Biology del Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Eslovenia, por invitación de su director, Profesor Vito Turk, entre el 10 y el 17 de Febrero de 1994.

- La Bioq. Berta Franke de Cazzulo visitó el Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Suecia, para trabajo colaborativo en electroforesis de campo pulsado con el Profesor Ulf Pettersson, entre el 9 y el 20 de Agosto de 1993.
- El Lic. Javier Martínez trabajó en el Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Suecia, del 1º de Agosto al 30 de Noviembre de 1993 y desde el 15 de Marzo al 15 de Septiembre de 1994.

Dr. Cazzulo visited Dr. James A. Dvorak, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, U.S.A., from March 15th to 27th, 1993.

Dr. Cazzulo visited the Department of Biochemistry and Molecular Biology, from the Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia, invited by its Director, Profesor Vito Turk, from February 10th and 17th, 1994.

- *Mrs. Berta Franke de Cazzulo visited the Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Sweden, for collaborative work on pulsed field gradient electrophoresis with Professor Ulf Pettersson, from August 9th to 20th, 1993.*
- *Mr. Javier Martínez worked at the Department of Medical Genetics, University of Uppsala, Sweden, from August 1st and November 30th, 1993 and from March 15th to September 15th, 1994.*

PRESENTACIONES POR INVITACION EN CONGRESOS CIENTIFICOS / INVITED PRESENTATIONS IN SCIENTIFIC MEETINGS

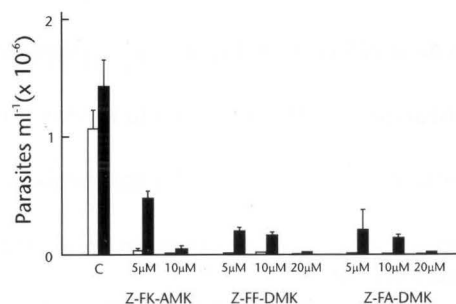
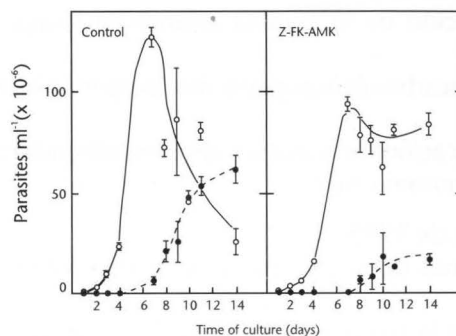
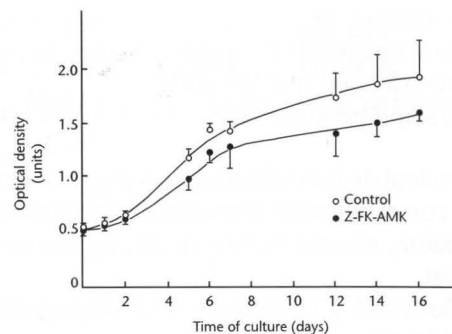
- III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI), Santiago, Chile, Abril de 1993.
- J.J. Cazzulo: Estructura e inmunogenicidad de la cistein proteinasa (cruzipaína) de *Trypanosoma cruzi*. Simposio: Inmunoparasitología: malaria, Chagas, Leishmania.
- Encuentro Iberoamericano sobre Estudios Moleculares de la Enfermedades de Chagas y de Leishmaniasis. CYTED/ CONICYT/Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. Abril de 1993.
- J.J. Cazzulo: Estructura y antigenicidad de la cisteína proteinasa (cruzipaína) de *Trypanosoma cruzi*.
- Segundas Jornadas de Actualización Bioquímica. Microbiología. Rosario.
- J.J. Cazzulo: Investigaciones recientes sobre la patogenicidad del *Trypanosoma cruzi*.
- Symposium on Protease inhibitors as a target for Parasite Chemotherapy. San Francisco, CA., U.S.A., October 1993.
- J.J. Cazzulo: Effect of cysteine proteinase inhibitors on growth and development of *Trypanosoma cruzi*.
- IV Congreso Argentino de Protozoología y Reunión de Investigadores de Chagas, San Fernando del Valle de Catamarca, Noviembre de 1993.
- J.J. Cazzulo: Enzimas del catabolismo de aminoácidos en *Trypanosoma cruzi*. Mesa Redonda sobre Bioquímica

y Biología Molecular de Trypanosomátidos.

- International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the adaptation and development of parasites. Solís, Uruguay, December 1993.
 - J.J. Cazzulo: Structure, antigenicity and possible functions of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*.
- 13th Winter School: Proteinases and their inhibitors - Recent Developments, Kranjska Gora, Gozd Martuljek, Slovenia, 1994.
 - J.J. Cazzulo: Cysteine proteinase inhibitors as potential drugs against Chagas Disease. Lecture.
- II Congreso Peruano de Parasitología, Trujillo, Perú, Julio de 1995.
 - J.J. Cazzulo: Obtención de proteínas de parásitos y su aplicación en la elaboración de pruebas diagnósticas y vacunas. Conferencia.
 - J.J. Cazzulo: Estructura, antigenicidad y posibles funciones de la cruzipaina, cisteína proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*. Simposio sobre Enfermedad de Chagas.
- 1st meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation. Portoroz, Slovenia, Septiembre - Octubre, 1995.
 - J.J. Cazzulo: Cysteine proteinases in *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatids.
- IVth International Symposium on proteinase Inhibitors and Biological Control. Brdo, Slovenia, Octubre, 1995.
 - J.J. Cazzulo: Heterogeneities in amino acid sequence and carbohydrate composition in the non-catalytic C-terminal domain of cruzipain.
- XII Congreso Latinoamericano de Parasitología, Santiago, Chile, Octubre de 1995.
 - J.J. Cazzulo: Inhibidores de proteinasas como posibles drogas antiparasitarias. Simposio sobre "Bioquímica comparada de parásitos".

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN
CONGRESOS CIENTIFICOS
NACIONALES E INTERNACIONALES /
COMMUNICATIONS PRESENTED IN
NATIONAL AND INTERNATIONAL
SCIENTIFIC MEETINGS**

- III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI), Santiago, Chile, Abril de 1993.
 - E.L. Malchiodi, M.G. Chiaramonte, J.A. Martínez, N.W. Zwirner, R.A. Margni and J.J. Cazzulo: Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* and an antigen (Ag163B6) isolated with a monoclonal antibody.
- IX International Congress of Protozoology, Berlin, Germany, July 1993.
 - J.J. Cazzulo, M. Montemartini, P. Barderi, C. Nowicki, U. Hellman and J.A. Santomé: Characterization of enzymes of amino acid catabolism from *Trypanosoma cruzi*.
 - B.M. Franke de Cazzulo, L. Sferco, M.J. North, G.H. Coombs and J.J. Cazzulo: Effect of proteinase inhibitors on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*.
- IV Congreso Argentino de Protozoología y Reunión de Investigadores de Chagas, San Fernando del Valle de



Effect of permeant irreversible cysteine proteinase inhibitors on the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. A, effect of Z-FK-AMK (●), at 5 μ M, on growth of epimastigotes (Tul 2 strain); (○), control. B, effect of Z-FK-AMK at 4 μ M, on growth of epimastigotes (○) and spontaneous differentiation to metacyclic trypomastigotes (●) (Sylvio X-10/7 clone). C, effect of Z-FK-AMK, Z-FF-DMK and Z-FA-DMK (at concentrations shown on the abscissa) on the production of trypomastigotes (RA strain) by infected Vero cells. The open bars indicate number of trypomastigotes, and the closed bars number of amastigotes, per ml of culture medium. The experimental conditions were as described in Franke de Cazzulo *et al.* (1994) FEMS Microbiol. Lett. 124, 81-86.

Catamarca, Noviembre de 1993.

- J.J. Cazzulo, B.M. Franke de Cazzulo, J. Martínez, M.J. North y G.H. Coombs: Efecto de inhibidores de proteinasas sobre el crecimiento y diferenciación de *Trypanosoma cruzi*.

C. Labriola y J.J. Cazzulo: Purificación de cistein proteinasas de Trypanosomátidos por cromatografía de afinidad en Cystatin-Sepharosa.

■ XXIX Reunión Nacional de SAIB, Villa Carlos Paz, Córdoba, Noviembre de 1993.

- M. Montemartini, J.J. Cazzulo, J.A. Santomé y C. Nowicki: Estudio de los residuos de media cistina de la tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi*.

- C. Nowicki, M. Montemartini, J.A. Santomé y J.J. Cazzulo: Catabolismo de aminoácidos aromáticos en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

- B.M. Franke de Cazzulo, J. Martínez, M.J. North, G.H. Coombs y J.J. Cazzulo: Inhibición de la diferenciación de *Trypanosoma cruzi* por inhibidores de cistein proteinasas.

- M.B. Reyes, G.D. Pollevick, C. Labriola, J.J. Cazzulo y A.C.C. Frasch: Clonado y secuenciación de un gen de *Trypanosoma cruzi* similar a las mucinas de mamíferos.

- C. Labriola y J.J. Cazzulo: Purificación de una cistein proteinasa similar a la cruzipaina a partir de epimastigotes de *Trypanosoma rangeli*.

- M. Bravo, A. Raimondi, U. Engström, G. Lindeberg, U. Hellman y J.J. Cazzulo: Péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la cruzipaina de *Trypanosoma cruzi* son utilizados como sustrato de la enzima.

- P. Barderi, O. Campetella, U. Hellman, J.A. Santomé y J.J. Cazzulo: Purificación y caracterización estructural de la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente (NADP-GDH) de *Trypanosoma cruzi*.

- C. Zelada, M. Montemartini, J.J. Cazzulo, J.A. Santomé y C. Nowicki: *Trypanosoma cruzi* posee dos actividades de alanina aminotransferasa (ALAT), una de ellas asociada a la tirosina aminotransferasa (TAT).

- F. Agüero, Y. Repetto y J.J. Cazzulo: Malato dehidrogenasa (MDH) en protoescolices de *Echinococcus granulosus*.

■ International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the adaptation and development of parasites. Solís, Uruguay, December 1993.

- F. Agüero, Y. Repetto and J.J. Cazzulo: Malate dehydrogenase (MDH) in protoscolices of *Echinococcus granulosus*.

■ V Congreso Latinoamericano de Cromatografía. Concepción, Chile, Enero de 1994.

- C. Nowicki, M. Montemartini, J.A. Santomé y J.J. Cazzulo: Caracterización por HPLC de metabolitos de aminoácidos aromáticos excretados al medio de cultivo por el *Trypanosoma cruzi*.

- C. Nowicki, M. Montemartini, J.A. Santomé y J.J. Cazzulo: Purificación de la tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi*. Aislamiento por HPLC de fragmentos peptídicos para ser secuenciados.

■ Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, U.S.A. September 1994.

- J.J. Cazzulo, F. Agüero, U. Hellman and Y. Repetto: Malate dehydrogenase in protoscolices of *Echinococcus granulosus*.

- C. Labriola, J.J. Cazzulo, J. Martínez, J. Henriksson and U. Pettersson: Purification and characterization of a cysteine proteinase homologous to cruzipain from *Trypanosoma rangeli*, and cloning and sequencing of its gene.

- XXX Reunión Nacional de SAIB, Puerto Iguazú, Misiones, Octubre de 1994.
 - C. Labriola, J.J. Cazzulo, J. Martínez, J. Henriksson y U. Pettersson: Caracterización de la rangelipaína, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma rangeli*, y clonado y secuenciación del gen que la codifica.
 - V. Stoka, A. Ritonja, N. Lenarcic, I. Dolenc, J.J. Cazzulo y V. Turk: Cruzipaína y catepsinas lisosomales L y S: Similitudes en propiedades y estructura.
 - J. Martínez, J. Henriksson, U. Pettersson y J.J. Cazzulo: El dominio C-terminal de la cruzipaína, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*: diferentes genes codifican proteínas con diferencias menores en secuencia.
 - A.J. Parodi, C. Labriola y J.J. Cazzulo: Algunas moléculas de cruzipaína, enzima lisosomal de *Trypanosoma cruzi*, tienen oligosacáridos de tipo complejo en su extremo C-terminal.
 - M. Montemartini, J. Búa, E. Bontempi, A.M. Ruiz, J.J. Cazzulo, J.A. Santomé y C. Nowicki: Purificación de la tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi* expresada en *Escherichia coli*.
 - C. Zelada, M. Montemartini, J.J. Cazzulo y C. Nowicki: Purificación de la alanina aminotransferasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
 - D.A. Maugeri, J.J. Cazzulo y J.J.B. Cannata: Actividades oxaloacético decarboxilásicas presentes en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
 - D.G.S. Capelluto, J.J. Cazzulo y J.J.B. Cannata: Caracterización y purificación de la serina hidroximetiltransferasa y de un inhibidor endógeno de la enzima en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- XXXI Reunión Nacional de SAIB, Villa Giardino, Córdoba, Noviembre de 1995.
 - V.G. Duschak, F. Parussini y J.J. Cazzulo: Estudios sobre las isoformas de la cruzipaína, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*.
 - V. Stoka, B. Turk, J.J. Cazzulo y V. Turk: Regulación de la actividad de la cruzipaína por inhibidores proteicos, las cistatinas.
 - D.A. Maugeri, J.J. Cazzulo y J.J.B. Cannata: Comportamiento histerético de la PEP carboxiquinasa de *Trypanosoma cruzi*.
 - D.G.S. Capelluto, J.J. Cazzulo y J.J.B. Cannata: Purificación y caracterización parcial de las serina hidroximetil transferasas de *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia fasciculata*.
 - C. Labriola, J.J. Cazzulo y A.J. Parodi: Modelo de control del plegamiento de glicoproteínas. Su comprobación experimental usando *Trypanosoma cruzi* como modelo experimental.
 - P. Barderi, O. Campetella, A.C.C. Frasch y J.J. Cazzulo: Clonado y secuenciación del gen que codifica para la glutamato dehidrogenasa NADP-dependiente (NADP-GDH) de *Trypanosoma cruzi*.
 - F. Agüero, U. Hellman, A. Zaha, J. Rodrigues, Y. Repetto y J.J. Cazzulo: Caracterización de la malato dehidrogenasa citosólica (cMDH) de protoescolices de *Echinococcus granulosus* y comparación con la enzima recombinante.
 - C. Zelada, J. Búa, E. Bontempi, M. Montemartini, A. Ruiz, J.A. Santomé, J.J. Cazzulo y C. Nowicki: Una tirosina aminotransferasa (TAT) recombinante de *Trypanosoma cruzi* presenta además actividad de alanina aminotransferasa.

**CONFERENCIAS DICTADAS EN
INSTITUCIONES DEL EXTERIOR /
LECTURES DELIVERED AT FOREIGN
INSTITUTIONS**

- 1-Structure, antigenicity and possible functions of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, U.S.A., 1993.
- 2-Structure, antigenicity and possible functions of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. AG Zellbiologie-Tumorbiologie, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, Germany, 1993.
- 3-Structure, antigenicity and possible function of the major cysteine proteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi*. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Eslovenia, 1994.
- 4-Rangelipain: a cysteine proteinase from *Trypanosoma rangeli*. Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, U.S.A., 1994.
- 5-La rangelipaina, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma rangeli*: Purificación, caracterización, clonado y secuenciación. Comparaciones con la cruzipaina. Facultad de Medicina, Sede Norte, Universidad de Chile, Santiago, 1995.
- 6-Estructura, antigenicidad y posibles funciones de la cruzipaina, cisteína proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*. Instituto de Biotecnología do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 1995.
- 7-Estructura, antigenicidad y posibles funciones de la cruzipaina, cisteína proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 1995.

SUBSIDIOS/GRANTS

- Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC). 1993 - 1995.
- Universidad de Buenos Aires. 1995.
- Fundación Antorchas. Subsidio para trabajo colaborativo con el Profesor Vito Turk (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Eslovenia) para estudiar varios aspectos de la cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi* (cruzipaina). / Grant for collaborative research with Professor Vito Turk (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia) to study several aspects of the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi* (cruzipain). 1995.

**CURSOS DE POST-GRADO /
POST-GRADUATE COURSES**

- "Bioquímica y Biología Celular de Parásitos" / "Biochemistry and Cell Biology of Parasites". Curso Pre-Congreso, II Congreso Peruano de Parasitología. Trujillo, Perú, 1º de Julio de 1995. Otros Profesores / Other Professors: Dres. Norbel Galanti (Chile), César Náquira, Ysabel Montoya y Martín López (Perú).
- "Tópicos de Parasitología Molecular" / "Subjects in Molecular Parasitology". Curso Pre-Congreso, XII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Santiago, Chile, 21 de Octubre de 1995. Otros Profesores / Other Professors: Dres. Oscar Competella (Argentina), Ricardo Ehrlich y Alberto Nieto (Uruguay), Aldo Solari, Myriam Lorca, Norbel Galanti, Antonio Morello y Ulises Vergara (Chile).

TESIS DOCTORALES / PH.D. THESES

- 1- Doctor en Ciencias Químicas **Javier Augusto Martínez**. "Estudio de aspectos estructurales y propiedades antigénicas de la cisteína proteinasa principal (cruzipaína) de *Trypanosoma cruzi*" / "Study of Structural aspects and antigenic properties of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1995.

TESINAS DE LICENCIATURA/ DEGREE MINI -THESES

- 1- Licenciado en Ciencias Biológicas **Fernán Gonzalo Agüero**. "Purificación y caracterización parcial de la malato dehidrogenasa citosólica presente en protoescolices del helminto parásito *Echinococcus granulosus*" / "Purification and partial characterization of the cytosolic malate dehydrogenase present in protoscolices of the parasitic helminth *Echinococcus granulosus*", Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.
- 2- Licenciada en Ciencias Biológicas **Sandra Inés Erika Metzner**, "Determinación de la posición de los oligosacáridos unidos a asparagina presentes en la cisteína-proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi* (cruzipaína)" / "Determination of the position of asparagine-linked oligosaccharides present in the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi* (cruzipain)". Universidad CAECE, Departamento de Ciencias Biológicas, 1995. (Co-dirigida con / co-directed with Dr. Armando J. Parodi.

JURADOS DE TESIS DOCTORAL / MEMBERSHIP OF PH.D. THESIS TRIBUNALS

- 1- Licenciada en Ciencias Biológicas **María Cristina Rilo**. Inhibidores fisiológicos y farmacológicos de la H^+ -ATPasa mitocondrial de *Trypanosomatídeos*. / *Physiological and pharmacological inhibitors of the H^+ -ATPase from Trypanosomatids*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.
- 2- Bioquímico **Miguel Angel Ballicora**. Análisis de los procesos de modulación y catálisis en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca. / *Analysis of the modulation and catalysis processes in fructose-1,6-bisphosphatase from spinach chloroplasts*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1993.
- 3- Lic. **Pedro Mariano Sanllorenti**. Efecto de la nutrición proteica sobre el metabolismo de las proteínas hepáticas solubles. Regulación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. / *Effect of protein nutrition on the metabolism of soluble hepatic proteins. Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 1993.
- 4- Lic. **Diego Frainderaich y Waisman**. Purificación, secuenciación y caracterización de un péptido presente en el intestino de *Triatoma infestans* que estimula la adenilil ciclase de *Trypanosoma cruzi* y promueve la metaciclologénesis / *Purification, sequencing and characterization of a peptide from the intestine of Triatoma infestans that stimulates adenyl cyclase in Trypanosoma cruzi and promotes metacyclogenesis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.
- 5- Lic. **Marcela L. Pinedo**. Actividades de los distintos sistemas proteolíticos en hojas de trigo. / *Activities of the*

different proteolytic systems in wheat leaves. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, 1994.

6-Lic. Claudia Margarita Ochatt. Foforilaciones y proceso endocítico temprano durante el ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. / *Phosphorylations and early endocytic process during the life cycle of the parasite Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1994.

7-Bioq. María Fabiana Drincovich. Fijación fotosintética del carbono en plantas superiores: Características de las enzimas implicadas. / *Photosynthetic carbon fixation in higher plants: Characteristics of the enzymes involved*. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, 1994.

8-Lic. Inés G. Fastame. Regulación de síntesis proteica en bacterias y parásitos. / *Regulation of protein synthesis in bacteria and parasites*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1995.

SOCIEDADES CIENTIFICAS / SCIENTIFIC SOCIETIES

1-Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).

Presidente Saliente (*Past President*) October 1991 - November 1993.

Representante de la Sección Bioquímica de Parásitos (*Representative of the Biochemical Parasitology Section*) November 1993 - November 1995.

2-Foro de Sociedades Científicas Argentinas / *Federation of Argentinian Scientific Societies*.

Representante Titular de SAIB hasta Noviembre de 1993 / *Representative of SAIB until November 1993*.

ORGANIZACION DE REUNIONES CIENTIFICAS / ORGANIZATION OF SCIENTIFIC MEETINGS

Organizador (como miembro de la Comisión Directiva de SAIB) / *Organizer (as member of the Executive Committee of SAIB)*:

1-XXIX Reunión Nacional de SAIB, Villa Carlos Paz, Córdoba, 1993.

2-XXX Reunión Nacional de SAIB, Puerto Iguazú, Misiones, 1994.

3-XXXI Reunión Nacional de SAIB, Villa Giardino, Córdoba, 1995.

ACTIVIDADES EN ORGANISMOS DE PROMOCION DE LA CIENCIA / ACTIVITIES IN SCIENCE PROMOTION INSTITUTIONS

1-El Dr. J.J. Cazzulo actúa como Coordinador del Nodo Argentino y como Coordinador Regional de la Red para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias en el Cono Sur de Latinoamérica, constituido en Julio de 1995 con participación de grupos de investigación de Argentina, Chile y Uruguay, con extensión a Bolivia, Paraguay, Perú y Sur del Brasil, y con financiación de SAREC/SIDA (Suecia) / *Dr. J.J. Cazzulo acts as National Coordinator for Argentina and as Regional Coordinator of the Network for Research and Training in Parasitic*

Diseases in the Southern Cone of Latin America, set up in July 1995, with participation of research groups in Argentina, Chile and Uruguay and extensions to Bolivia, Paraguay, Perú and the South of Brazil, funded by SAREC/ SIDA (Sweden).

- 2- Durante el periodo cubierto por la presente Memoria, el Dr. J.J. Cazzulo ha continuado desempeñándose como miembro del Comité Editorial de *Molecular and Biochemical Parasitology*, Elsevier, Amsterdam / *During this period, Dr. J.J. Cazzulo has continued to belong to the Editorial Board of Molecular and Biochemical Parasitology, Elsevier, Amsterdam.*

Técnicos de Investigación / *Technical Assistance*

Bravo, Marta
Curto, María de los Angeles
Raffo, Susana
Romano, Catalina
Rosetti, Gabriela
Sakson, Mario

Biblioteca / *Library*

Jefe / *Head*: Suter, Georgina
Fernández, Cristina
Telesca, Nora
Simsolo, José

Bioterio / *Animal House*

Fraga, Favio

Mantenimiento / *Maintenance Service*

Delgado Sanz, Víctor
Genovese, Salvador
Irusta, Francisco
Leiman, Fabián
Mazzardi, Margarita
Velázquez, Máximo

Depósito / *Store room*

Jefe / *Head*: Kauffman, Aída

Administración / Administration

Jefe / Head: Giusti, Claudio

Saba, Tilda

Alonso, Liliana

Guevara, Silvia

Rearte, Carmen

Romanello, Mónica

Schimenovich, Ernesto

Sourigues, Griselda

Relaciones Institucionales / Public Relations

Daniele, Jorge

Pico Estrada, Tomás

Luciano, Vanina

CyT-Programa de Divulgación Científica y Técnica
Programme for Science and Technology Divulgation

Personal Permanente / Permanent Staff

Enrique Belocopitow - Director / *Director*

Fernando Ritacco - Coordinador / *Coordinator*

Alicia T. Calabrese - Personal Técnico Profesional /
Professional Technical Personnel

Becarios Post-Grado / Post-Graduate Fellows

Matías Loewy (1-3-93 al 28-2-94)

Mariana Rutitzky (1-3-93 al 28-2-94)

Elena Levy Yeyati (1-3-93 al 28-2-94)

Rosana Errasti (1-3-94 al 28-2-95)

Marcos Neuman (1-3-94 al 28-2-95)

David Bilenca (1-3-95 al 28-2-96)

Débora Frid (1-3-95 al 28-2-96)

La función de este grupo de trabajo es la de transferencia de información científica y técnica al resto de la sociedad, tanto la generada por los investigadores argentinos como la relevante internacionalmente.

Despertar el interés y lograr que el público tenga conocimiento de los logros y de la metodología científica, como aventura intelectual, va a influir sobre los medios políticos y económicos de nuestro país, para poder pasar de una política científica declamatoria a una política científica participativa, en la que el trabajo científico sea dirigido hacia la solución de nuestros problemas nacionales y, por ende, se lo requiera y se lo respete. Que la investigación científica, además de su valor cultural, adquiera valor operativo generalizado.

Esto señala la necesidad de una profunda y masiva campaña de "cientificación" de la educación, de la cultura en general, de la economía y de la política argentina. Para que ello ocurra, el "soberano", el pueblo, debe cobrar conciencia de la importancia de la actividad científica.

Y si el hombre común no va en busca del conocimiento científico, debe ser el conocimiento científico el que vaya en busca del hombre común. Para ello, es necesario que la mayoría de la gente se entere de los cambios que la investigación científica y el desarrollo tecnológico han producido, producen y van a producir en la vida del hombre. Es necesario que la información llegue a través de la escuela, que esté contenida en los diarios y revistas, en las emisiones de las radiodifusoras y en los medios televisivos que el pueblo lee, escucha y mira habitualmente. Para ello deben interactuar pedagogos, periodistas e investigadores científicos con el objeto de producir un flujo constante de información que sirva para que la divulgación científica sea fidedigna, atractiva y formativa de una conciencia colectiva sobre este tema.

El objetivo más amplio se traducirá como: inserción de la ciencia en la cultura general de la población, para que ésta pueda influir con conocimiento de causa en

The goal of this group is to work in the transference of scientific and technological information to the rest of the society. The source of this information are the results obtained by researchers in Argentina as well as those internationally relevant.

To awaken the interest in science for the layman and to learn about the scientific achievements and methods, is an intellectual adventure, which surely will influence the political and economical media in our country, so as to change from a declamatory scientific politic in a participative scientific program. In this last case, scientific work would be concentrated in solving national problems and, as a consequence, be required and respected. In other words, it is desired that scientific research, in addition to its cultural supply, acquire a public operative value.

This fact emphasizes the need for a deep and massive campaign, led to the insertion of science throughout the country, in education, culture in general, economics and politics. In order to reach this purpose, the "sovereign", that is to say "the people" should be well informed about the importance of scientific activity. And, if the layman cannot approach scientific knowledge, scientific knowledge should approach the layman. In that sense, it is necessary that most of the people get in touch with the changes that scientific research and technological development have produced, is producing and will produce during the life of a man. This information should be given through school, newspapers, journals, radio and TV that people usually read, listen or watch. Teachers, journalists and scientific researchers should work harmonically in order to keep a constant flow of information which will make scientific divulgation to be trustworthy, attractive and able to educate a massive conscience on the matter.

The widest aim will be translated as: insertion of science in the general culture of the people, so that this can influence on situations that affect its work, its quality of life and its own existence.

For those who have already left the college or university

muchas situaciones que afectan su trabajo, su calidad de vida y aún su propia existencia.

Esta inserción, en la mayoría de la población, que ya no es asistente regular a escuelas o universidades, deberá hacerse a través de los medios de comunicación masiva, que la población habitualmente lee, escucha y ve.

La influencia que los medios de comunicación masiva tiene en la formación de la opinión pública y en el conocimiento que potencialmente puede transmitir, los convierten en el instrumento que debe utilizarse para llamar la atención y poner en marcha los contactos de los potenciales usuarios del conocimiento: los investigadores. Esos potenciales usuarios son todos: los productores industriales y agropecuarios, los hombres de estado en toda la gama de sus responsabilidades, el sector docente en los distintos niveles de enseñanza, los componentes de la estructura sanitaria como médicos y pacientes; los mismos periodistas que deciden en los medios de comunicación qué se debe difundir, etc.

Esta transferencia se hace preparando notas periodísticas con temas de ciencia y publicándolas principalmente en medios escritos: diarios y revistas.

A pesar de que los periodistas profesionales que trabajan en los medios de comunicación masiva pueden hacer notas interesantes y atractivas no suelen disponer de información científica conceptualmente profunda. Por otro lado, los investigadores que sí tienen información científica al día y conceptualmente rica, suelen carecer de la capacidad de escribir para el gran público. Por ello, se decidió formar recursos humanos "ad-hoc", capaces de acceder a la información técnico científica de primera mano y convertirla en notas periodísticas atractivas, fidedignas y comprensibles para el hombre común.

Para llevar a cabo esta función se capacitan graduados universitarios y terciarios. Anualmente se llevan a cabo

life, information should be obtained from massive communication media which they are used to read, listen and watch.

The influence that the mass media has on public opinion and the information it can potentially spread, turns them into the instrument used for calling attention and starting the contacts between the potential users of scientific and technological knowledge and its source: the researchers. These potential users are: industrial and agronomy executives, statesmen in all scopes of responsibility, teachers at all levels, members of health organizations, such as: physicians and patients and even journalists who will decide what kind of information is worthy to be communicated through mass media, etc.

This transfer is done by writing scientific new articles and publishing them mainly in the written media: newspapers and magazines.

Although professional journalists working in mass media may write interesting and attractive articles, they may not have the necessary and deep scientific background. On the other hand, researchers who have a rich and up-to-date scientific information, usually lack skills for writing articles devoted to a large audience. This is why it was decided to form human resources "ad-hoc", able to access to first-hand scientific and technological information and turn it into attractive, trustworthy and comprehensible journalistic articles for common readers.

In order to achieve this purpose, university graduates and students are trained in several courses and workshops which are annually delivered. In addition, during 1993 three full-time scholarships were afforded by the foundation "Banco de la Provincia de Buenos Aires" (2) and Mapfre Foundation (1).

During 1994 and 1995, they were continued by the foundation "Banco de la Provincia de Buenos Aires" exclusively. The place of work is: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Luis F. Leloir", Buenos Aires and the School

concursos abiertos para optar a becas anuales de dedicación exclusiva. Los estipendios de las becas fueron financiados durante el año 1993 por la Fundación Banco Provincia de Buenos Aires (2) y por la Fundación Mapfre (1). Las de 1994 y 1995 por la Fundación Banco Provincia de Buenos Aires exclusivamente. El ámbito de capacitación es el Instituto de Investigaciones Bioquímicas y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Para el cumplimiento de los objetivos indicados se organizaron además cursos-taller de "Introducción al Periodismo Científico" destinados a graduados universitarios y terciarios. La capacitación a través de becas y cursos se ha traducido en la publicación de 303 (trescientos tres) notas en los más importantes diarios y revistas del país, tales como: Clarín, La Nación, Página 12, First, Descubrir y Campo y Tecnología.

of Sciences of the University of Buenos Aires.

To achieve the goals indicated, courses- workshops on "Introduction to scientific journalism" have been organized and aimed towards university and college graduates.

The training through scholarships and courses has been translated in the publication of 303 (three hundred and three) articles in the most important argentine newspapers such as Clarín, La Nación, Página 12 and magazines as First, Descubrir and Campo y Tecnología.

Three-hundred and three articles were published in the most important newspapers and magazines of the country: "Clarín", "La Nación", "Página 12", "First", "Descubrir", and "Campo y Tecnología".

CONGRESOS CIENTIFICOS (POR INVITACION) / PARTICIPATION IN SCIENTIFIC CONGRESS (BY INVITATION)

Dr. Enrique Belocopitow participó en los siguientes eventos / *Dr. Enrique Belocopitow participated in the following events:*

- Reunión Internacional "Información sobre Medicamentos" organizada por Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y Organización Panamericana de la Salud. Panel sobre "Ética de Medicamentos" en el que trató el tema "Fidelidad y confiabilidad de la información sobre medicamentos en los medios de comunicación masiva"; abril 28-30, 1993. / *International meeting on "Information on drugs", organized by U.S. Pharmacopeia, School of Pharmacy and Biochemistry of the University of Buenos Aires and Panamerican Health Organization; member of the session on: "Ethics of drugs"; subject: "Accuracy and trustworthiness of mass media information on drugs"; April 28-30, 1993.*
- Jornada Franco-Argentina "Ética y Medicina en Transplantes" organizada por la Fundación Rhone-Alpes, Fundación Favaloro, Asociación Argentina de Transplantes y Embajada de Francia. Participación en el panel sobre "Medios de comunicación en la donación de órganos" en el que trató el tema "Información versus sensacionalismo"; noviembre 20, 1993 / *French-Argentine meeting on "Ethics and Medicine in transplants", organized by Rhone-Alpes Foundation, Favaloro Foundation, Argentine Association of Transplants and French Embassy in Buenos Aires; member of the session on: "Mass media in organs donation"; subject: "Information versus sensationalism"; November 20, 1993.*
- XXV Congreso Argentino de Genética/III Jornadas Argentino-Uruguayas de Genética. Tema "Genética: Mitos y realidades en los medios de comunicación social"; agosto 31, 1994. / *XXV Argentine Congress on Genetics/ III*

Argentine-Uruguayan Meeting on Genetics; subject: "Genetics: Myths and Realities in the social communication media"; August 31, 1994.

PARTICIPACION EN CONFERENCIAS Y PANELES / PARTICIPATION IN LECTURES AND WORKSHOPS

- "La Iglesia escucha las nuevas realidades" organizado por la Conferencia Episcopal Argentina; Moderador del panel en el que se trató el tema "Desarrollo Científico, Tecnológico y Cambios Culturales que plantean Cuestiones Éticas"; junio 23, 1993. / *Argentine Episcopalian Conference on "Church listening to new realities"; coordinator of the meeting on "Scientific and technological development as well as cultural changes provoking ethical problems"; June 23, 1993.*
- En el Seminario de "Expertos Latinoamericanos residentes fuera de sus países de origen para ampliar las fronteras de la producción a través de la investigación e innovación tecnológica", organizado por la SECyT y el CONICET. Participó en el panel sobre el "Papel de los Medios de la Difusión de la Ciencia y la Innovación Tecnológica" y expuso el tema: "La Divulgación Científica como herramienta de vinculación entre el sector científico y el productivo"; septiembre 17, 1993. / *Seminar on "Latin-American experts living abroad, to widen production borders through research and technological innovation"; organized by SECYT and CONICET; Participation in the session on "Role of mass media in science and technology innovation", subject: "Scientific dissemination as a mean for relating the scientific sector and the productive one"; September 17, 1993.*
- II Jornadas sobre Formación de Periodistas Científicos y I Jornadas Argentinas de Divulgación Científica y Educación, organizadas por la Asociación Argentina de Divulgación Científica. Conferencia de Apertura que versó sobre "Generación de Recursos Humanos para la traducción de la Ciencia al resto de la Sociedad"; octubre 29, 1994. / *II Meeting on Training of Scientific Journalists and 1st Argentine meeting on Scientific Divulgateion and Education", organized by the Argentine Association of Scientific Divulgateion; Opening lecture referred to "Training of human resources for the translation of scientific language to the rest of the society"; October 29, 1994.*
- Invitado por el Ministerio de Cultura de España para participar en un panel del Encuentro España-Argentina 1995, sobre "Ciencia, Educación y Sociedad" en el que disertó sobre "Medios de Comunicación Masiva, Ciencia y Educación"; abril 22, 1995. / *Invited by the Ministry of Culture of Spain to participate in a session of the 1995 Spanish-Argentine meeting on "Science, education and society"; he referred to: "Mass media , science and education"; April 22, 1995.*
- Invitado por el Club de Roma para participar en la Jornada de "Educación, Trabajo y Valores" de un panel en el que habló sobre "Educación, Ciencia y Trabajo". 1995. / *Invited by the Roma Club to participate in the meeting "Education, Work and Values"; he referred to: "Education, science and work"; 1995.*

CURSOS DE POSTGRADO/ POST GRADUATE COURSES

- a) Se llevaron a cabo tres Cursos-Taller anuales destinados a graduados universitarios sobre "Introducción al Periodismo Científico". Director del curso: Dr. Enrique Belocopitow; otros docentes: Licenciados: Ana Maria Vara,

Susana Gallardo y Fernando Ritacco. / *Three annual courses-workshops on "Introduction to scientific journalism" were held for university graduates; Director of the course: Dr. Enrique Belocopitow; "Assistant professors: Graduates: Ana María Vara, Susana Gallardo and Fernando Ritacco.*

b) Otras instituciones / *Other institutions*

- 1993: Miembro del Jurado para la adjudicación de los Premios Konex en Ciencia y Tecnología para la década 1983-1993. / *Member of the jury: selecting committee for the Konex Prizes of Science and Technology for the decade 1983-1993.*
- 5-7-93: Miembro del Jurado para proveer por concurso dos cargos de Profesores Titulares Ordinarios, uno de dedicación simple y otro de dedicación exclusiva, de Química Biológica del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján. / *Member of the jury to appoint one part-time and other full-time professor positions; Biological Chemistry, Department of Basic Sciences, National University of Luján.*
- 1994: Participó como profesor de un curso de "Periodismo Médico" organizado por la Sociedad de Periodismo Médico de la Asociación Médica Argentina. / *Professor in the course on "Medical journalism", organized by the Medical Journalism Society of the Argentine Medical Association.*
- 24-5-95: Miembro del Jurado para decidir la adjudicación de los Premios FUND-TV a los mejores programas televisivos que tuvieron mayores aportes educativos durante 1994. / *Member of the selection Committee for the FUND-TV Prizes to the best TV Programmes which made the highest educative contributions during 1994.*
- 18-9-95: Miembro del Jurado para proveer un cargo de Jefe de Trabajos Prácticos con Dedicación Exclusiva (por concurso) en el Centro de Divulgación Científica dependiente del Decanato de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. / *Member of the selection Committee to appoint a full-time Assistant Professor in the Scientific Divulcation Center of the School of Pharmacy and Biochemistry of the University of Buenos Aires.*

**PREMIOS Y DISTINCIONES /
PRIZES AND DISTINCTIONS**

- 1993-1994: Premio en las "IV Jornadas de integración por el Conocimiento y el Esfuerzo para dar y servir", organizado por la radio Frecuencia Especial 93,1 FM. / *Award in the "IV Meeting on integration by knowledge and effort to give and serve"; organized by Special Frequency Radio 93,1 MF.*
- 1995: Premio Longines al Periodismo. Destacado en el rubro Ciencia y Tecnología del año 1995. / *Longines Award to Journalism; subject: "Science and Technology for the year 1995.*

CONFERENCISTAS DEL EXTERIOR

- 1993** Dr. Beatriz Pogo (USA)
Dr. Edwin Krebs (USA)
Dr. Gerardo Lederkremer (Universidad de Tel Aviv, Israel)
Dr. Jorge Filmus (Canadá)
Dr. Michel Sela (Instituto Weizmann - Israel)
Dr. Oscar Pogo (USA)
Dr. Pedro Puig Domenech (España)
Dr. Silvio Gutkind (USA)
Dr. Takashi Akazawa (Japón)
Dr. Marcelo Tolmasky (Universidad de Oregon, USA)
- 1994** Dr. Adolfo Iribarren (IRBN - Roma - Italia)
Dr. Alberto Iglesias (Michigan State University, USA)
Dr. Carlos Hirschberg (USA)
Dr. Carlos Labate (Escuela de Agronomía - Universidad de San Pablo)
Dr. César Milstein (Londres)
Dr. Daniel Naor (Universidad Hebrea - Jerusalén)
Dr. David Sabatini (University New York Medical Center, USA)
Dr. Ernesto Bade (Universidad de Constanza, Alemania)
Dr. Federico Welsch (OIA-NEI Bethesda, USA)
Dr. Gerald Edwards (USA)
Dr. Gonzalo Prat Gay (Brasil)
Dr. Gregorio Chazenbalk (University of California - San Francisco-USA)
Dr. Gregorio Weber (USA)
Dr. J.J. Miret (USA)
Dr. Jack Preiss (Michigan State University - USA)
Dr. José María Trifaró (Ottawa)

CONFERENCISTAS DEL EXTERIOR

(continuación)

Dr. Juan José Lafaille (Brasil)
Dr. Luis Rokeach (Univ. Montreal - Canadá)
Dr. Alberto Macario (USA)
Dr. Michel Veron (Francia)
Dr. Phil Stahl (Washington University - St. Louis - USA)
Dr. R. Amils (Univ. Autónoma de Madrid - España)
Dr. Roald Nezlin (Instituto Weizmann - Israel)
Dr. Rodolfo García (Ctro. Intern. de Ing. Genética y Biotec. (UNIDO), Trieste, Italia)
Dr. S. Petterson
Dr. Thomas Jovin (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry - Alemania)
Dra. Estela Medrano (Univ. de Cincinnati, USA)
Dra. Lucía Rothman (Univ. Chicago - Illinois-USA)
Dra. Mirta Sivak (Michigan State University, USA)
Dra. Patricia Leoni (Dpto. de Medicina del Hosp Hammersmith, Londres)
Prof. Dr. A. Pühler (Univ. Bielefeld - Alemania)
Prof. Dr. F. Zadrazil (Inst. Braunschweig - Alemania)
Prof. Han Ping Guan (Michigan State University, USA)

1995

Dr. Alberto Ochoa (Instituto Pasteur - París)
Dr. Allen Bush (Universidad de Maryland, USA)
Dr. Andrés Muro (Trieste - Italia)
Dr. Antonio Morello (Facultad de Medicina - Universidad de Chile)
Dr. Carlos Hirschberg (USA)
Dr. Daniel Blanregard (Universidad de Cambridge - Reino Unido)
Dr. Echeverría (University of Florida, USA)
Dr. Eduardo Blumwald (Universidad de Toronto, Canadá)
Dr. Elibio Rech Filho (EMBRAPA - Brasilia)



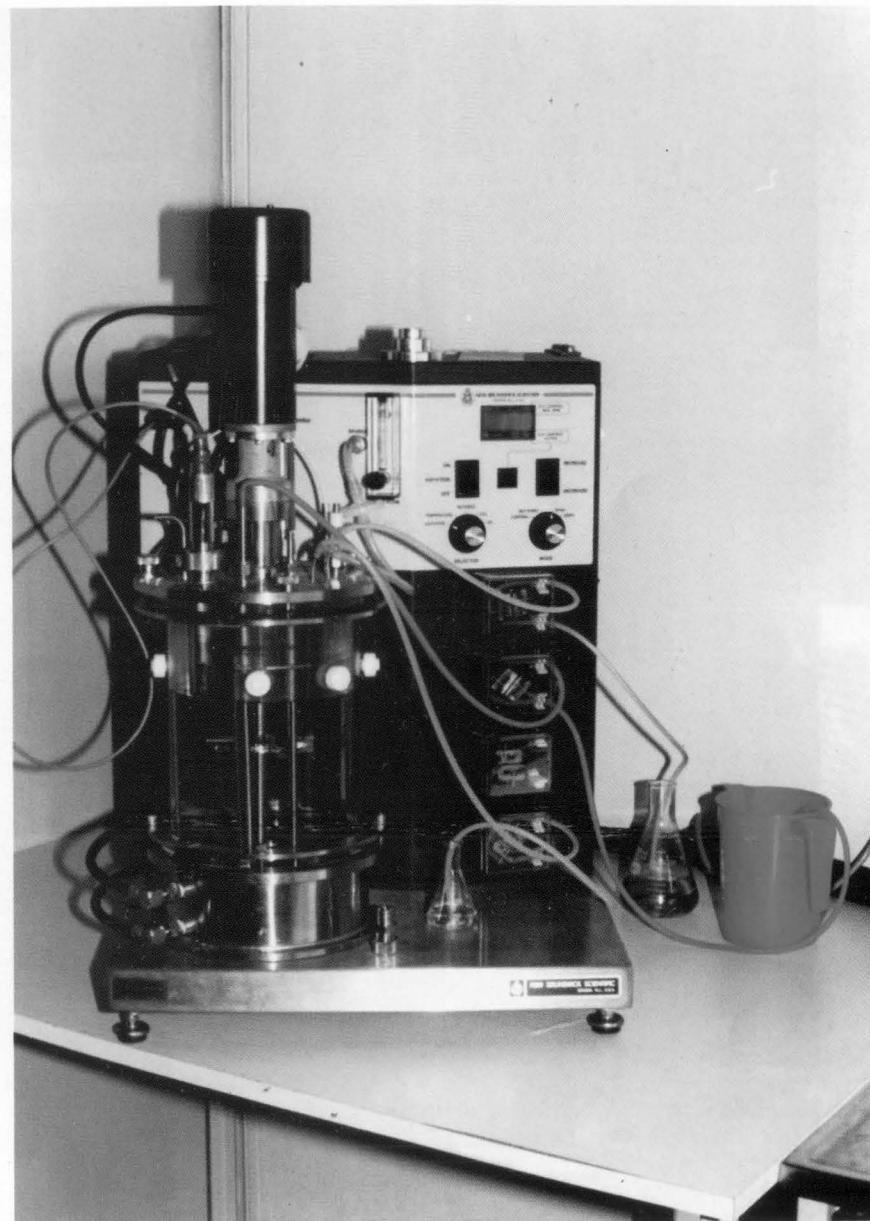
Laboratorio de Trabajos Prácticos / *Teaching Laboratory*



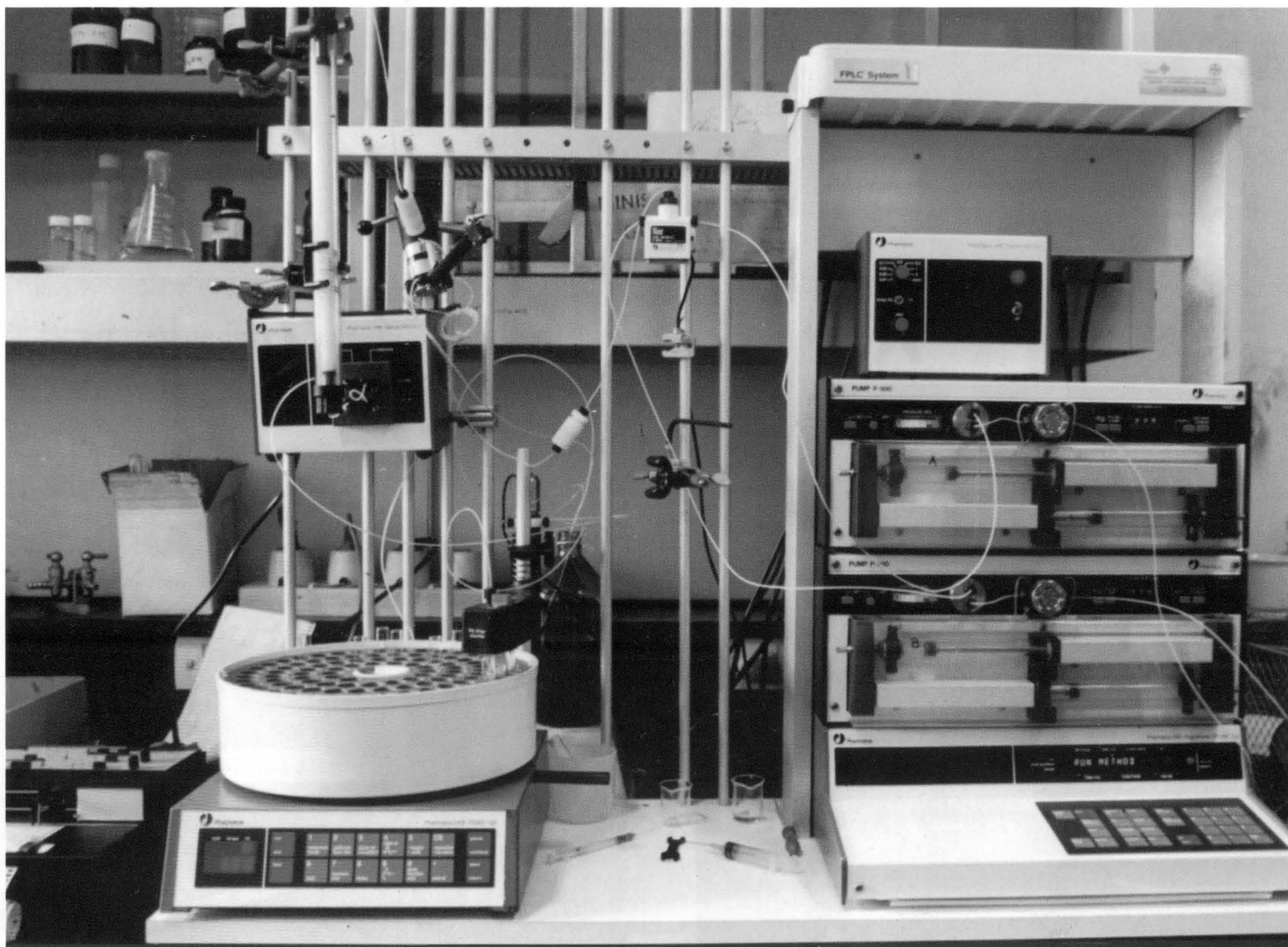
Trabajo de laboratorio / Laboratory work



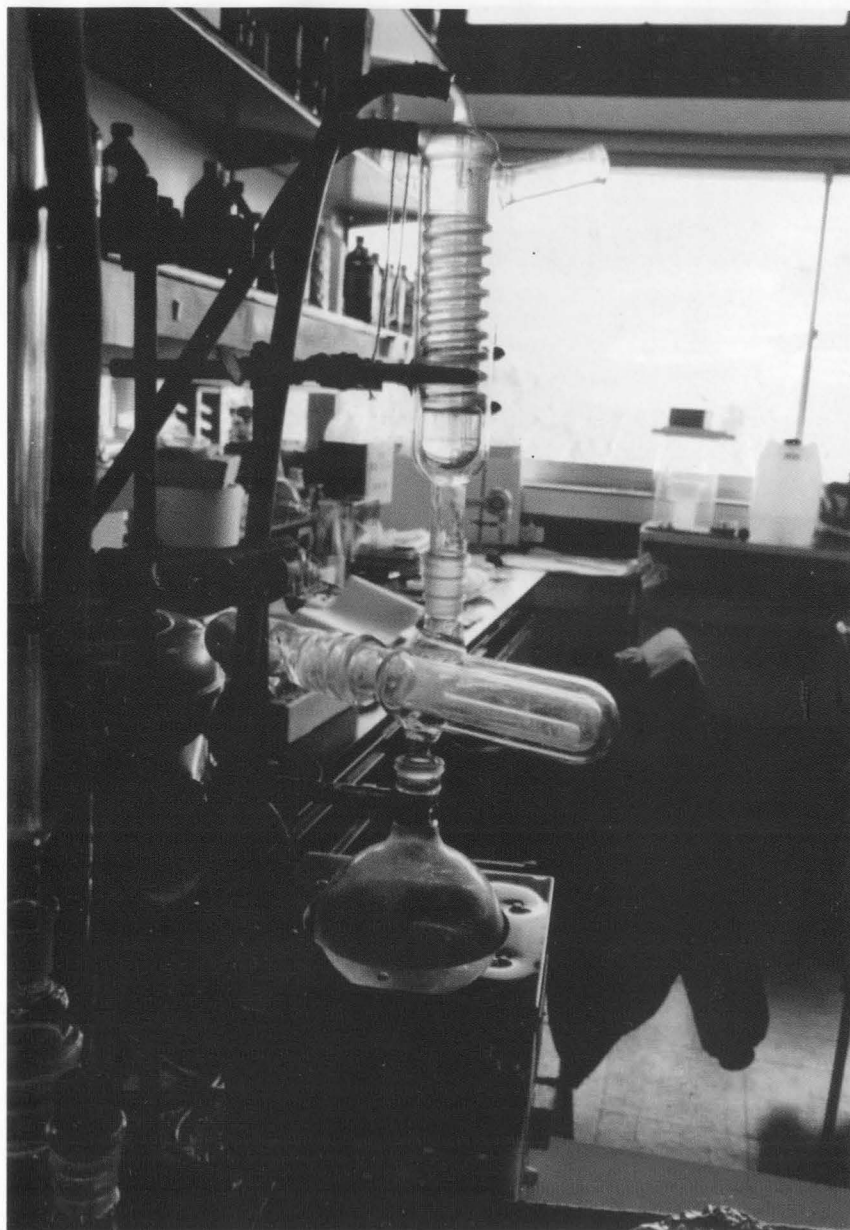
Trabajo de laboratorio / *Laboratory work*



Un fermentador en pequeña escala / *A small scale microbial fermentor*



Cromatografía rápida de proteínas / *Fast protein liquid chromatography*



Equipos de laboratorio / Laboratory equipment



Cultivo de plantas y células vegetales / *Plant and plant cell culture*



La Sra. Amelia Zuberbühler de Leloir descubre una placa en homenaje al Dr. Luis F. Leloir en la plaza que llevará su nombre / *Mrs. Amelia Zuberbühler de Leloir unveils a memorial to Dr. Luis F. Leloir in the square which will bear his name.*



Salón de Seminarios / *The Seminar Room*

CONFERENCISTAS DEL EXTERIOR

(continuación)

Dr. Facundo Morello (ICGEB - Trieste - Italia)
Dr. Fernando Noriega (Univ. de Arizona)
Dr. Gregorio Weber (USA)
Dr. Guillermo Goldstein (Universidad de Hawaii)
Dr. Israel Silman (Weizmann Institute, Israel)
Dr. Jorge Filmus (Canadá)
Dr. Juan Carlos García Ballesta (Centro de Biología Molecular - Madrid, España)
Dr. Luis Rokeach (Univ. Montreal - Canadá)
Dr. Marcelo Tolmasky (Oregon Health Sciences University, USA)
Dr. Marcos Intaglieta (Universidad de California, USA)
Dr. Norberto Palleroni (Depto. Microbiología Univ. New York, USA)
Dr. Oscar Burrone (ICGEB Trieste, Italia)
Dr. Peter Bryant (University of California, USA)
Dr. Phil Stahl (Washington University - St. Louis - USA)
Dr. Takashi Akazawa (Japón)
Dr. Thomas Jovin (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry - Alemania)
Dr. Vito Turk (Josef Stefan Institute Slovenia)
Dr. Yuti Chernajovsky (Kennedy Institute of Rheumatology, Londres)
Dra. Doron Lancet (Inst. Weizmann - Israel)
Dra. Renata Wulf
Prof. Ana Cristina Miranda Brasileiro (EMBRAPA, Brasil)
Prof. F. Zadrazil (Inst. Braunschweig - Alemania)

**CURSOS DE GRADO /
DEGREE COURSES**

AÑO 1993 / YEAR 1993

- 1- Desarrollo y Diferenciación "A" (Morfogénesis y Embriología Molecular) / Development and Differentiation "A" (Morphogenesis and Molecular Embryology).**
Coordinador / Coordinator: Dr. Luis A. Quesada Allué.
Profesores / Professors: Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.
- 2- Química Biológica II B. Enzimología de Alimentos / Biological Chemistry IIB. Food Enzymology.**
Director del Curso / Course Director: Dra. Juana S. Tandecarz.
Profesores / Professors: Dr. Héctor Carminatti - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélide S. González - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dr. Rodolfo Ugalde - Dra. Juana S. Tandecarz.
- 3- Seminario de Licenciatura / Degree Seminar.**
Coordinadores / Coordinators: Profesores del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA / Professors from Instituto de Investigaciones Bioquímicas, School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires.

AÑO 1994 / YEAR 1994

- 1- Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular "A" / Biochemistry and Molecular Biology: Laboratory Techniques "A".**
Director del Curso / Course Director: Dr. Luis A. Quesada Allué.
Profesores / Professors: Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dra. Nélide S. González - Dr. Manuel García Patrone - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dr. Tomás Santa Coloma - Dra. Diana S. Tolmasky - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.
- 2- Química Biológica II "A" / Biological Chemistry II "A".**
Directores del Curso / Course Directors: Drs. Héctor Carminatti and Silvia Moreno.
Profesores / Professors: Dr. Israel D. Algranati - Dr. Manuel García Patrone - Dr. Luis Jiménez de Asúa (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dra. Clara R. Krisman - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Rodolfo Ugalde - Dra. Juana S. Tandecarz - Dra. Silvia Moreno.
- 3- Química Biológica II B. Enzimología de Alimentos / Biological Chemistry IIB. Food Enzymology.**
Coordinadora / Coordinator: Dra. Juana S. Tandecarz.
Profesores / Professors: Dr. Héctor Carminatti - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélide S. González - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dr. Rodolfo Ugalde - Dra. Juana S. Tandecarz.

4- Desarrollo y Diferenciación "C" / *Development and Differentiation "C"*.

Coordinador / *Coordinator*: Dr. Luis A. Quesada Allué.

Profesores / *Professors*: Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.

5- Seminario de Licenciatura / *Degree Seminar*.

Coordinadores / *Coordinators*: Profesores del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA / *Professors from Instituto de Investigaciones Bioquímicas, School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires*.

AÑO 1995 / YEAR 1995

1- Química Biológica II "A" / *Biological Chemistry II "A"*.

Director del Curso / *Course Director*: Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

Profesores / *Professors*: Dr. Israel D. Algranati - Dr. Néstor Carrillo (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Eduardo Ceccarelli (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. José María Delfino (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Mario Ermácora (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde - Dr. Alejandro Viale (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.

2- Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular "A" / *Biochemistry and Molecular Biology Techniques "A"*.

Coordinador / *Coordinator*: Dr. Luis A. Quesada Allué.

Profesores / *Professors*: Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dra. Nélida González - Dr. Manuel García Patrone - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dr. Tomás Santa Coloma - Dra. Juana S. Tandecarz - Dra. Diana S. Tolmasky - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.

3- Seminario de Licenciatura / *Degree Seminar*.

Coordinadores / *Coordinators*: Profesores del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA / *Professors from Instituto de Investigaciones Bioquímicas, School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires*.

4- Desarrollo y Diferenciación "C" / *Development and Differentiation "C"*.

Coordinador / *Coordinator*: Dr. Luis A. Quesada Allué.

Profesores / *Professors*: Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.

CURSOS DE POST-GRADO /
POST-GRADUATE DEGREE COURSES

AÑO 1993 / YEAR 1993

- 1- Química Biológica Superior. Avances en el conocimiento de los polisacáridos y glicoproteínas / *Advanced Biological Chemistry. Advances in the Knowledge of Polysaccharides and Glycoproteins.***
Coordinadores / *Coordinators:* Dr. Héctor Carminatti and Dr. Silvia Moreno.
Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dr. Luis Jiménez de Asúa (INGEBI, Buenos Aires) - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.
- 2- Seminarios de Química Biológica Superior (I y II) / *Seminars in Advanced Biological Chemistry (I and II).***
Coordinadora / *Coordinator:* Dra. Clara R. Krisman.
Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélide S. González - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Daniel O. Sánchez - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.
- 3- Desarrollo y Diferenciación (Morfogénesis y Embriología Molecular) "A" y "B" / *Development and Differentiation (Morphogenesis and Molecular Embryology) "A" and "B".***
Coordinador / *Coordinator:* Dr. Luis A. Quesada Allué.
Profesores / *Professors:* Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.
- 4- Manipulación Genética en Bacterias / *Genetic Manipulation in Bacteria.***
Coordinador / *Coordinator:* Dr. Luis Ielpi.
Profesores / *Professors:* Angel Cataldi (INTA, Castelar) - Marcelo Tolmasky (Oregon Health Science University, Portland, Oregon, USA).
- 5- Bases Celulares y Moleculares de la Comunicación Neuronal: Formación y Funcionamiento de la Sinapsis / *Cellular and Molecular Bases of Neuronal Communication: Formation and Function of the Synapsis.***
Coordinador / *Coordinator:* Dr. Víctor Idoyaga Vargas.
Profesores / *Professors:* Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Jorge Medina (Instituto de Biología Celular "E. de Robertis", Facultad de Medicina, UBA) - Dr. Osvaldo Uchitel (Instituto de Biología Celular "E. de Robertis", Facultad de Medicina, UBA).

6- Química Biológica II B. Enzimología de Alimentos / *Biological Chemistry IIB. Food Enzymology.*
Coordinadora / *Coordinator:* Dra. Juana S. Tandecarz.
Profesores / *Professors:* Dr. Héctor Carminatti - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélida S. González - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde.

7- Estrategias básicas para el cultivo de Tejidos Vegetales / *Basic Strategies for Plant Tissue Culture.*
Coordinadora / *Coordinator:* Dra. Silvia Moreno.
Profesores / *Professors:* Dra. Silvia Moreno - Dr. Luis A. Quesada Allué.

AÑO 1994 / YEAR 1994

- 1- Expresión génica en células de mamíferos / *Gene expression in mammalian cells.***
Directores del Curso / *Course Directors:* Drs. Ernesto Bade y Estela Medrano.
Coordinadores / *Coordinators:* Drs. Israel D. Algranati y Luis Ielpi.
Profesores / *Professors:* Dr. Ernesto Bade (University of Konstanz, Alemania) - Dra. Estela Medrano (Universidad de Ohio, USA) - Dra. María Teresa Téllez de Iñón (INGEBI, Buenos Aires).
- 2- Química Biológica Superior. Avances en el conocimiento de los polisacáridos y glicoproteínas / *Advanced Biological Chemistry. Advances in the Knowledge of Polysaccharides and Glycoproteins.***
Directores del Curso / *Course Directors:* Drs. Héctor Carminatti y Silvia Moreno.
Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Luis Jiménez de Asúa (INGEBI, Buenos Aires) - Dra. Clara R. Krisman - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dra. Juana S. Tandecarz - Dra. Silvia Moreno - Dr. Rodolfo Ugalde.
- 3- Seminario de Química Biológica Superior I y II / *Seminars in Advanced Biological Chemistry I and II.***
Coordinador / *Coordinator:* Dr. Roberto J. Staneloni.
Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélida S. González - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Daniel O. Sánchez - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.
- 4- Bioquímica del Suelo y de la Planta / *Soil and Plant Biochemistry.***
Directores del Curso / *Course Directors:* Drs. Norberto Palleroni y Ricardo Wolosiuk.
Coordinador / *Coordinator:* Dr. Ricardo A. Wolosiuk.
Profesores / *Professors:* Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dr. Norberto Palleroni (New York University, New York, USA) - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

- 5- **Bioquímica y Biología Molecular de Trypanosomátidos / *Biochemistry and Molecular Biology of Trypanosomatids.***
 Director del Curso / *Course Director:* Dr. Juan J. Cazzulo.
 Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Juan José Cazzulo - Dra. Mirtha Flawiá (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Carlos Frasch - Dra. Nélica S. González - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Daniel O. Sánchez - Dra. María Teresa Téllez de Iñón (INGEBI, Buenos Aires).

- 6- **Las Funciones Microbicidas e Inflamatorias del Neutrófilo Humano: Bioquímica y Biología Molecular / *Microbicide and Inflammatory Functions of the Human Neutrophile: Biochemistry and Molecular Biology.***
 Director del Curso / *Course Director:* Dr. Rodolfo García (ICGEB, Trieste, Italia).
 Coordinadores / *Coordinators:* Drs. Juana S. Tandecarz y Héctor Carminatti.
 Profesores / *Professors:* Dr. Rodolfo García - Dra. Lucía Kordich (Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires)- Dra. Patricia Leoni (Depto. de Medicina del Hospital Hammersmith, Londres, Inglaterra) - Dr. Julio C. Sánchez Avalos (Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires).

- 7- **Química Biológica II B. Enzimología de Alimentos / *Biological Chemistry IIB. Food Enzymology.***
 Director del Curso / *Course Director:* Dra. Juana S. Tandecarz.
 Profesores / *Professors:* Dr. Héctor Carminatti - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélica S. González - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde.

- 8- **Desarrollo y Diferenciación "C" / *Development and Differentiation "C".***
 Director del Curso / *Course Director:* Dr. Luis A. Quesada Allué.
 Profesores / *Professors:* Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.

- 9- **Relación Estructura-Función de Proteínas: Modificación Química y Mutagénesis Dirigida / *Structure-Function Relationship in Proteins: Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis.***
 Director del Curso / *Course Director:* Dr. Jack Preiss (Michigan State University, USA).
 Coordinadores / *Coordinators:* Dr. Héctor Carminatti y Dra. Juana S. Tandecarz.
 Profesores / *Professors:* Dr. Alberto Iglesias (Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Han Ping Guan (Michigan State University,USA)- Dr. Carlos Labate (Depto. de Genética, Universidad de San Pablo, Brasil) - Dr. Jack Preiss (Michigan State University,USA) - Dra. Mirta Sivak (Michigan State University,USA).

- 10- **Bases Celulares y Moleculares de la Comunicación Neuronal: Formación y Funcionamiento de la Sinapsis / *Cellular and Molecular Bases of Neuronal Communication: Formation and Function of the Synapsis.***
 Director del Curso / *Course Director:* Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas.
 Profesores / *Professors:* Dr. Héctor Carminatti - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Jorge Medina (Instituto de Biología Celular "E. de Robertis", Facultad de Medicina, UBA)- Dr. José María Trifaró (Department of

Pharmacology, Medical School, University of Ottawa) - Dr. Osvaldo Uchitel (Instituto de Biología Celular "E. de Robertis", Facultad de Medicina, UBA).

11- Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular "B" y "C" / *Biochemistry and Molecular Biology: Laboratory Techniques "B" and "C".*

Seminario de Introducción a las Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular / *Biochemistry and Molecular Biology: Laboratory Techniques.*

Director del Curso / *Course Director:* Dr. Luis A. Quesada Allué.

Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dra. Nélida S. González - Dr. Manuel García Patrone - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dr. Tomás Santa Coloma - Dra. Juana S. Tandecarz - Dra. Diana S. Tolmasky - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.

AÑO 1995 / YEAR 1995

1- Tópicos Selectos en Química Biológica y Biología Celular: Modificación Post-traducciona y Plegamiento de las Proteínas / *Selected Topics in Biological Chemistry and Cellular Biology: Post-translational Modification and Protein Folding.*

Seminario sobre Aspectos del Plegamiento de Proteínas / *Seminar on Aspects of Protein Folding.*

Director del Curso / *Course Director:* Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

Profesores / *Professors:* Dr. Néstor Carrillo (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Eduardo Ceccarelli (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. José María Delfino (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Mario Ermácora (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Alejandro Viale (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

2- Química Biológica Superior / *Advanced Biological Chemistry.*

Director del Curso / *Course Director:* Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.

3- Seminarios de Química Biológica Superior I y II / *Seminars on Advanced Biological Chemistry I and II.*

Coordinador / *Coordinator:* Dr. Roberto J. Staneloni.

Profesores / *Professors:* Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélida S. González - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Daniel O. Sánchez - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dr. Rodolfo Ugalde - Dr. Ricardo A. Wolosiuk.

- 4- **Regulación de la transcripción en eucariotes / *Regulation of transcription in eukaryotes.***
 Director del Curso / Course Director: Dr. Alberto Ochoa (Instituto Pasteur, París, Francia).
 Coordinador / Coordinator: Dr. Héctor Carminatti.
 Profesores / Professors: Dr. Alberto Ochoa (Instituto Pasteur, París, Francia) - Dr. Andrés Muro (ICGEB, Trieste, Italia).

- 5- **Transformación y expresión de genes en tejidos vegetales / *Gene expression and transformation in plant tissues.***
 Director del Curso / Course Director: Dra. Juana S. Tandecarz y Dr. Roberto J. Staneloni.
 Profesores / Professors: Dra. Ana Miranda Brasileiro (EMBRAPA, Brasil) - Dr. Elibio Rech Filho (EMBRAPA, Brasil) - Dr. Roberto J. Staneloni.

- 6- **Estrategias para el cultivo de tejidos vegetales / *Strategies for the culture of plant tissues.***
 Director del Curso / Course Director: Dra. Silvia Moreno.
 Profesores / Professors: Dra. Silvia Moreno - Dr. Luis A. Quesada Allué.

- 7- **Patogénesis bacteriana / *Bacterial pathogenesis.***
Biología Molecular de la Patogénesis Bacteriana / *Molecular Biology of Bacterial Pathogenesis.*
 Director del Curso / Course Director: Dr. Luis Ielpi.
 Profesores / Professors: Dra. Mariana Catalano (Facultad de Medicina, UBA) - Dr. Angel Cataldi (INTA, Buenos Aires) - Dr. Guillermo Del Bosco (Hospital de Clínicas, UBA) - Dra. Ana Di Martino (Sanatorio Mitre, Buenos Aires) - Dr. Luis Ielpi - Dr. Marcelo Tolmasky (Oregon, Health Science University, Portland, Oregon, USA).

- 8- **Desarrollo y Diferenciación "C" / *Development and Differentiation "C".***
 Director del Curso / Course Director: Dr. Luis A. Quesada Allué.
 Profesores / Professors: Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Alberto Kornblihtt (INGEBI, Buenos Aires) - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Leonardo Satz (Cátedra de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires) - Dr. Pablo Wappner.

- 9- **Bases Celulares y Moleculares de la Comunicación neuronal: Formación y Funcionamiento de la Sinapsis / *Cellular and Molecular bases of neuronal communication: Formation and function of the synapsis.***
 Director del Curso / Course Director: Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas.
 Profesores / Professors: Dr. Héctor Carminatti - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Alberto Macario (Wadsworth Center for Laboratories and Research, Department of Health, Albany, New York, USA) - Dr. Jorge Medina (Instituto de Biología Celular "E. de Robertis", Facultad de Medicina, UBA).

10- Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular "B" y "C" / Biochemistry and Molecular Biology Techniques "B" and "C".

Seminario de Introducción a las Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular / Introductory Seminar to Biochemistry and Molecular Biology Techniques.

Coordinador / Coordinator: Dr. Luis A. Quesada Allué.

Profesores / Professors: Dr. Israel D. Algranati - Dr. Héctor Carminatti - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Marcelo A. Dankert - Dr. Manuel García Patrone - Dra. Nélica S. González - Dr. Víctor P. Idoyaga Vargas - Dr. Luis Ielpi - Dra. Clara R. Krisman - Dra. Silvia Moreno - Dr. Armando J. Parodi - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Luis A. Quesada Allué - Dr. Roberto J. Staneloni - Dra. Juana S. Tandecarz - Dra. Diana S. Tolmasky - Dr. Ricardo A. Wolosiuk - Dra. Angeles Zorreguieta.

11- Proteinásas y sus inhibidores / Proteinases and their inhibitors.

Coordinador / Coordinator: Dr. Juan José Cazzulo.

Profesores / Professors: Dra. Mirta Biscoglio de Jiménez Bonino (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Joaquín Cannata (Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) - Dr. Juan José Cazzulo - Dr. Osvaldo L. Podhajcer - Dr. Jorge Sánchez (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata) - Dra. Verónica Stoka (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia) - Dr. Vito Turk (Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia).

Diseño Gráfico: MARCIA HELMAN
Preimpresión: SPEEDGRAF
Imprenta y encuadernación: LATIN GRAFICA

